



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO SOBRE PARASITOSSES CARDIOPULMONARES E GASTROINTESTINAIS  
EM PINÍPEDES NUM CONTEXTO ZOOLOGICO

INÊS DA SILVA SOLEIRO NUNES MARCELINO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

Dra. Carla Anne Flanagan

ORIENTADOR

Dra. Carla Anne Flanagan

COORDINADOR

Doutor Jorge Manuel Jesus Correia

2015  
LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO SOBRE PARASITOSSES CARDIOPULMONARES E GASTROINTESTINAIS  
EM PINÍPEDES NUM CONTEXTO ZOLÓGICO

INÊS DA SILVA SOLEIRO NUNES MARCELINO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

Dra. Carla Anne Flanagan

ORIENTADOR

Dra. Carla Anne Flanagan

COORIENTADOR

Doutor Jorge Manuel Jesus Correia

2015

LISBOA

---

*“Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light.”*

Albus Dumbledore

(Steve Kloves)

A ti, Pai.

A ti, Avó Amélia.

As saudades são infinitas...

Comigo estão:

*“Until the very end.”*

J.K. Rowling



## **AGRADECIMENTOS**

---

A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, me ajudaram no meu percurso académico e na conclusão desta etapa. Um sincero agradecimento!

À Dra. Carla Flanagan, minha orientadora, por me mostrar o extraordinário mundo dos mamíferos marinhos e medicina de zoo e por me permitir fazer parte dele.

Ao Professor Doutor Jorge Correia, meu coorientador, por todo o apoio e disponibilidade para ajudar na concretização desta dissertação.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, pelo apoio e partilha de conhecimento do que é o fantástico mundo da parasitologia.

À Dra. Ana Margarida Alho, por toda a incansável ajuda! Por acreditares em mim, no meu trabalho e por todo o entusiasmo que me deste!

Ao Dr. Vito Colela, pela ajuda com a identificação morfológica dos parasitas.

À Dra. Lídia Gomes, pelo apoio que me deu no laboratório e por todas as conversas interessantes. A todos os colegas do laboratório, pelos momentos animados!

A toda a Equipa Veterinária do Zoomarine: Carla Flanagan (novamente), Nuno Urbani, Raquel Fernandes e Joana Silva, por me terem aceite na vossa equipa e por todos os conhecimentos partilhados. Pela paciência de ensinar e incutir espírito crítico. E, também de extrema importância, por todos os momentos de diversão! Ao Miguel Silveira, por todo o apoio disponibilizado e ao Marco Bragança, pela ajuda na correção da tese.

À Antonieta Nunes, por tudo o que me ensinaste. Ganhei em ti uma grande amiga! Ao Marco Gago, pelas conversas animadas e pela divertida companhia!

A todos os colaboradores do Zoomarine, à equipa das Aves, do Aquário e dos Mamíferos Marinhos, por toda a experiência partilhada durante o meu período de estágio. Um obrigado especial à equipa dos Pinípedes, pelas recolhas de amostras.

Ao Alexandre Botelho, pelo pouco, mas absolutamente fantástico, tempo que passámos juntos no Zoomarine, e por me teres feito tantos favores ao longo de toda a produção da minha tese. Por todas as gargalhadas, todas as conversas, pela paciência e pela amizade!

Aos amigos que na faculdade conheci: Alexandre Donas-Botto, Ana Xavier, Carolina Caldeirinha, Catarina Pissarra, Clarisse Piloto, Gonçalo Pedreira, Inês Félix, João Diogo Ferreira, João Teotónio, João Vistas, Nuno Gonçalves, Rafaela Fiúza, Rita Serrenho e Xavier Nascimento. Um grande obrigado a todos vocês! Por todos os bons momentos, desde que entrei na faculdade até ao dia de hoje. Pela vossa amizade. Obrigada por fazerem do mundo da Veterinária, um mundo divertido e animado!

Aos amigos que em Espanha fiz, por me terem mostrado que o mundo é enorme e a amizade existe para além fronteiras. Um obrigado especial à Dee Levinte e à Sabine Wilden, por terem sido grandes amigas e, mesmo longe, por estarem sempre tão perto.

Ao Avô Zé, pelos bons momentos. A todos os amigos e familiares que me apoiaram num momento menos bom da minha vida, deixo-vos aqui um obrigado cheio de carinho. Especialmente ao grande amigo do meu Pai, Coronel Afonso e sua mulher Margarida, mesmo à distância, estiveram sempre presentes.

À Rosário, que desde sempre esteve comigo. Por toda a ajuda na correção da tese e por me acompanhar desde pequenina nos momentos bons e menos bons da vida.

Ao Andrea, porque “Dos cosas te cambian la vida: enamorarte e irte de Erasmus.” Obrigado por tudo!

Ao Tiago, por ser uma grande companhia e um bom irmão. Sabes que és o meu irmão preferido de todos os meus irmãos rapazes!

Para ti, Mãe, um obrigado infinito, daqueles que começam e nunca acabam. Por tudo o que fizeste por mim. Desde ajudar-me a decorar os nomes dos ossos até à coragem que me deste para terminar a minha jornada. Por acreditares em mim e me dares sempre o empurrão que preciso. Sem ti não estaria hoje a completar o meu percurso académico. Sem ti não seria o que sou hoje. Por isso tudo e muito mais, obrigado sempre.

*“Let us step into the night and pursue that flighty temptress, adventure.”*

J.K. Rowling

## RESUMO

---

### **Estudo sobre Parasitoses Cardiopulmonares e Gastrointestinais em Pinípedes num Contexto Zoológico**

Com o objetivo de identificar parasitas e doenças parasitárias de pinípedes que vivem sob cuidados humanos em Portugal, realizou-se um estudo sobre parasitoses cardiopulmonares e gastrointestinais na coleção de pinípedes pertencente ao Zoomarine – Mundo Aquático S.A., que se situa no Algarve.

No total, foram colhidas 19 amostras sanguíneas e 79 amostras fecais de 20 indivíduos de três espécies: foca-comum (*Phoca vitulina*) (n=6), foca-cinzenta (*Halichoerus grypus*) (n=2) e leão-marinho-californiano (*Zalophus californianus*) (n=6) e de uma subespécie, otária-sul-africana (*Arctocephalus pusillus pusillus*) (n=6). As amostras sanguíneas foram analisadas utilizando o teste rápido de antigénio WITNESS®Dirofilaria e a técnica de Knott modificada. Para as amostras fecais utilizaram-se as técnicas de McMaster, Flutuação de Willis, Sedimentação em meio saturado, Técnica de Baermann modificada e esfregaços fecais corados pela técnica de Ziehl-Neelsen.

O teste rápido foi positivo em duas focas-comuns e detetaram-se microfilárias correspondentes a *D. immitis* numa otária-sul-africana. As análises fecais, na sua totalidade, foram consideradas negativas.

Realizou-se também a identificação morfológica de nemátodes encontrados em necrópsias de duas otárias-sul-africanas e seu exame histopatológico correspondente. Os vermes adultos encontrados no coração e artéria pulmonar foram identificados como *D. immitis*, tornando-se este trabalho, no conhecimento da autora, o primeiro registo em *A. p. pusillus* a nível mundial e também o primeiro registo da infeção por este nemátode em pinípedes em Portugal.

Atendendo a que o Algarve é considerado uma região endémica para este parasita e sendo a Dirofilariose uma doença re-emergente nesta e noutras zonas do País, é importante dar uma continuidade a este e outros estudos sobre parasitas transmissíveis por vetores, para melhor compreender os efeitos desta e outras parasitoses em pinípedes em ambiente zoológico.

**Palavras-chave:** pinípedes, parasitas, *Dirofilaria immitis*, *Arctocephalus pusillus pusillus*, *Phoca vitulina*, Portugal.





## ABSTRACT

---

### Cardiopulmonary and Gastrointestinal Parasites in Pinnipeds in a Zoological Context

In order to identify parasites and parasitic diseases of pinnipeds that live under human care in Portugal, we performed a study on cardiopulmonary and gastrointestinal parasites in the pinniped group belonging to Zoomarine – Mundo Aquático S.A., which is located in the Algarve.

In total, 19 blood samples and 79 fecal samples were collected from 20 individuals from three species: common seal (*Phoca vitulina*) (n=6), grey seal (*Halichoerus grypus*) (n=2) and California sea lion (*Zalophus californianus*) (n=6) and from one subspecies, South African fur seal (*Arctocephalus pusillus pusillus*) (n=6). Blood samples were tested using a *Dirofilaria immitis* commercial antigen test (WITNESS®*Dirofilaria*) and modified Knott's technique. Fecal samples were tested using McMaster technique, Willis Flotation, Sedimentation, modified Baermann technique and fecal smears stained by Ziehl-Neelsen technique.

Two samples from common seals tested positive in the antigen test and one sample from a South African fur seal showed microfilariae consistent with *D. immitis*. All the fecal samples tested negative.

The morphological identification of worms found in necropsies of two South African fur seals was also performed, as well as, the corresponding histopathological analysis. The adult worms found in the heart and pulmonary artery at the necropsies, were identified as *D. immitis*, and to the author's knowledge, this work is the first world report of *D. immitis* infection in *A. p. pusillus* and the first report of this nematode in a pinniped group in Portugal.

As the Algarve is considered an endemic area for this parasite and as *Dirofilariasis* is a reemergent disease in several areas of the country, it is important to continue researching this and other vector-borne diseases in order to fully understand the effects of parasitic diseases in pinnipeds in a zoological context.

**Key words:** pinnipeds, parasites, *Dirofilaria immitis*, *Arctocephalus pusillus pusillus*, *Phoca vitulina*, Portugal.



## ÍNDICE

---

Agradecimentos.....	iii
Resumo .....	v
Abstract .....	vii
Lista de Figuras .....	xi
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos .....	xiv
I. Atividades Desenvolvidas durante o Estágio Curricular .....	1
1. Estágio em Medicina de mamíferos marinhos e animais exóticos no Zoomarine 1	
2. Estágio no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias e no Laboratório de Anatomia Patológica na FMV-UL.....	3
II. Introdução.....	4
III. Revisão Bibliográfica .....	5
1. Pinípedes .....	5
1.1. Foca-comum ( <i>Phoca vitulina</i> ).....	7
1.2. Foca-cinzenta ( <i>Halichoerus grypus</i> ) .....	8
1.3. Leão-marinho-californiano ( <i>Zalophus californianus</i> ) .....	9
1.4. Otária-sul-africana ( <i>Arctocephalus pusillus pusillus</i> ) .....	9
2. Contexto zoológico.....	10
2.1. Instalações.....	11
2.2. Alimentação .....	12
2.3. Maneio e comportamentos médicos voluntários.....	13
3. Parasitas observados em Pinípedes .....	14
3.1. Nemátodes.....	14
3.1.1. <i>Dirofilaria immitis</i> .....	15
3.1.2. <i>Acanthocheilonema spirocauda</i> .....	17
3.1.3. <i>Acanthocheilonema odendhali</i> .....	19
3.1.4. <i>Otostrongylus circumlitus</i> .....	19
3.1.5. <i>Parafilaroides (Filaroides) spp</i> .....	21
3.1.6. Anisakidae .....	24
3.1.7. Ancylostomatidae.....	27
3.1.8. <i>Trichinella</i> spp.....	29
3.2. Céstodes.....	30
3.3. Tremátodes.....	31
3.4. Acantocéfalos .....	32
3.5. Protozoários.....	33
3.5.1. <i>Giardia</i> spp.....	33
3.5.2. <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	35
3.5.3. Outras coccídeas .....	36

3.6. Hemoplasmas .....	37
IV. Estudo sobre Parasitoses Cardiopulmonares e Gastrointestinais em Pinípedes num Contexto Zoológico .....	39
1. Objetivos do Estudo .....	39
2. Material e Métodos.....	39
2.1. Caracterização da população amostrada e local de recolha.....	39
2.2. Colheita e processamento de amostras .....	40
2.3. Métodos utilizados no processamento e análise das amostras .....	41
2.3.1. Processamento de Amostras Sanguíneas.....	41
2.3.1.1. Imunomigração rápida.....	41
2.3.1.2. Técnica de Knott modificada .....	41
2.3.1.3. Fosfatases ácidas .....	42
2.3.1.4. Esfregaços sanguíneos .....	42
2.3.2. Processamento de Amostras Fecais .....	43
2.3.2.1. Técnica de McMaster .....	43
2.3.2.2. Flutuação pelo método de Willis .....	44
2.3.2.3. Sedimentação em meio saturado .....	44
2.3.2.4. Técnica de Baermann .....	45
2.3.2.5. Esfregaços fecais .....	45
2.3.3. Identificação de vermes adultos .....	45
2.3.4. Técnica de Necrópsia .....	46
2.3.5. Processamento de amostras para histopatologia .....	47
2.4. Análise estatística .....	47
3. Resultados .....	47
3.1. Análises sanguíneas .....	47
3.2. Análises fecais .....	49
3.3. Identificação de parasitas.....	49
3.4. Análise anatomopatológica .....	50
3.5. Outros resultados.....	54
3.6. Resumo dos resultados gerais .....	54
4. Discussão .....	55
V. Conclusão e perspetivas futuras.....	65
Referências bibliográficas.....	66
Anexos .....	75
Anexo 1 – Rastreio de Dirofilariose realizado no Zoomarine durante o decorrer do estágio. ....	75
Anexo 2 – Resultados obtidos nas análises das amostras em estudo.....	76
Anexo 3 – Diferenciação morfológica entre vermes do coração de pinípedes.....	77
Anexo 4 – Resultados de análises realizadas em laboratório externo. ....	78

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 – Esquema ilustrativo das espécies de focídeos existentes a nível mundial. ..	6
Figura 2 – Esquema ilustrativo das espécies de otariídeos existentes a nível mundial. 7	
Figura 3 – Foca-comum ( <i>Phoca vitulina</i> ) no Zoomarine (cortesia de Raquel Fernandes). .....	8
Figura 4 – Foca-cinzenta ( <i>Halichoerus grypus</i> ) no Zoomarine (cortesia de Raquel Fernandes). .....	9
Figura 5 – Leão-marinho-californiano ( <i>Zalophus californianus</i> ) no Zoomarine (cortesia de Raquel Fernandes). .....	10
Figura 6 – Otária-sul-africana ( <i>Arctocephalus pusillus pusillus</i> ) (fêmea e macho) no Zoomarine (cortesia de Raquel Fernandes). .....	10
Figura 7 – Exemplo de um habitat e piscina na área dos pinípedes no Zoomarine (fonte: Zoomarine). .....	11
Figura 8 – Possível ciclo de vida e vias de transmissão de <i>Acanthocheilonema spirocauda</i> em <i>Phoca vitulina</i> e <i>Echinophytirius horridus</i> . L1-4: primeiro a quarto estágio larvar; L4?: sem descrições detalhadas disponíveis; (traduzido e adaptado de Leidenberger <i>et al.</i> , 2007). .....	18
Figura 9 – Ciclo de vida de <i>Pseudoterranova decipiens</i> (adaptado de Measures, 2014). .....	26
Figura 10 – Ciclo de vida de <i>Uncinaria lucasi</i> (adaptado de Dailey, 2005). .....	28
Figura 11 – Realização de testes rápidos WITNESS® <i>Dirofilaria</i> (original). .....	41
Figura 12 – Realização de técnica de Knott modificada. Preparação (A) e Observação (B) (original). .....	42
Figura 13 – Técnicas de Baermann, sedimentação e flutuação (original). .....	43
Figura 14 – Técnica de sedimentação em meio saturado (original). .....	44
Figura 15 – Vermes adultos retirados da artéria pulmonar durante uma necrópsia de <i>A. p. pusillus</i> (escala em cm) (original). .....	46
Figura 16 – Corte das amostras para exame histopatológico e colocação nas cassetes (original). .....	47
Figura 17 – Os dois testes rápidos WITNESS® <i>Dirofilaria</i> nos quais se obteve resultado positivo (original). .....	48
Figura 18 – Microfilária observada através de técnica de Knott (original). .....	48
Figura 19 – Presença de estruturas semelhantes a <i>Mycoplasma</i> , indicadas pelas setas, em esfregaço sanguíneo corado por Giemsa (original). .....	49

Figura 20 – Pormenor da extremidade anterior (A) e extremidade posterior (B) de uma fêmea encontrada na artéria pulmonar (original).....	50
Figura 21 – Presença de parasitas no ventrículo direito aberto de <i>A. p. pusillus</i> (Caso 1) (fonte: Zoomarine). ....	51
Figura 22 – Aspeto macroscópico do pulmão de <i>A. p. pusillus</i> (Caso 2) (fonte: Zoomarine). ....	51
Figura 23 – Histopatologia de pulmão de <i>A. p. pusillus</i> (Caso 1) (original).....	52
Figura 24 – Histopatologia de pulmão de <i>A. p. pusillus</i> (Caso 2) (original).....	52
Figura 25 – Histopatologia de fígado (Caso 2), denotando-se congestão (H&E, 100x) (original).....	53
Figura 26 – Histopatologia de rim de <i>A. p. pusillus</i> (Caso 2) (original). ....	53
Figura 27 – Histopatologia de linfonodos mediastínicos de <i>A. p. pusillus</i> (Caso 2) (original).....	54
Figura 28 – Resultado negativo do qPCR <i>Dirofilaria</i> realizado em sangue em EDTA, na subespécie <i>A. p. pusillus</i> . ....	78
Figura 29 – Resultado negativo do qPCR <i>Dirofilaria</i> realizado em sangue em EDTA, na espécie <i>P. vitulina</i> . ....	78
Figura 30 – Resultado negativo (ligeira reação) do teste ELISA realizado com amostra de soro, na subespécie <i>A. p. pusillus</i> . ....	79

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 – Peixes e cefalópodes que compõem a dieta da coleção zoológica do Zoomarine (adaptado de Santos, 2011).....	13
Tabela 2 – Nemátodes observados em pinípedes (adaptado de Lauckner, 1985; Bowman, 2014).....	15
Tabela 3 – Espécies de <i>Parafilaroides</i> spp. e respectivos hospedeiros identificados (adaptado de Measures, 2001; Dailey, 2006; Dailey, 2009).....	22
Tabela 4 – Hospedeiros definitivos presentemente identificados, por marcadores genéticos moleculares, para <i>Pseudoterranova</i> spp de pinípedes (adaptado de Mattiucci & Nascetti, 2008). ....	24
Tabela 5 – Hospedeiros definitivos presentemente identificados, por marcadores genéticos moleculares, para <i>Contracaecum</i> spp. de pinípedes (adaptado de Mattiucci & Nascetti, 2008) .....	25
Tabela 6 – Distribuição do número de amostras por espécie.....	39
Tabela 7 – Resumo dos resultados gerais obtidos (n=19). ....	54
Tabela 8 – Resultados dos testes rápidos para diagnóstico de <i>D. immitis</i> realizados no Zoomarine. ....	75
Tabela 9 – Resultados obtidos no total de amostras analisadas.....	76
Tabela 10 – Algumas diferenças morfológicas entre <i>D. immitis</i> e <i>A. spirocauda</i> .....	77



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

% – Por cento  
µg – Micrograma  
µm – Micrómetro  
ABVT – Azoto básico volátil total  
ADN – Ácido desoxirribonucleico  
ARN – Ácido ribonucleico  
BID – *bis in die* (duas vezes por dia)  
CID – Coagulação intravascular disseminada  
cm – Centímetro  
CVBD – *Canine Vector Borne Diseases*  
dpi – Dias pós infecção  
EDTA – *Ethylene Diamine Tetra acetic Acid*  
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária  
g – grama  
HD – Hospedeiro definitivo  
HI – Hospedeiro intermediário  
Kcal – Quilocaloria  
kg – Quilograma  
L1 – Larva de primeiro estágio  
L2 – Larva de segundo estágio  
L3 – Larva de terceiro estágio  
L4 – Larva de quarto estágio  
L5 – Larva de quinto estágio  
m – Metro  
mg/kg – Miligrama por quilograma  
ml – Mililitro  
mm – Milímetro  
n – Número total de amostras  
°C – Grau Celsius  
OPG – Ovos por Grama de fezes  
PCR – *Polymerase chain reaction*  
PO – *per os*  
qPCR – *Quantitative Polymerase Chain Reaction*  
RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*  
s.s. – *sensu stricto*  
SC – Subcutâneo  
SID – *semel in die* (uma vez por dia)  
sp. – Espécie  
spp. – Espécies  
TBA – Índice do ácido tiobarbitúrico  
UL – Universidade de Lisboa

## **I. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR**

### **1. Estágio em Medicina de mamíferos marinhos e animais exóticos no Zoomarine**

Foi realizado um estágio curricular no parque oceanográfico “Zoomarine – Mundo Aquático S.A.” no Algarve, com a duração de seis meses, compreendidos entre o dia 1 de Outubro 2014 e o dia 30 de Março 2015, na área de medicina de mamíferos marinhos e animais exóticos.

O Zoomarine tem nove áreas zoológicas diferentes, nas quais alberga todos os espécimes da sua coleção. Os mamíferos marinhos dividem-se por quatro áreas, sendo realizada uma separação entre golfinhos-roazes e pinípedes. As aves compõem dois grupos, as rapinas e as tropicais, em duas áreas distintas. Existe também o “Américas”, que consiste num habitat de imersão. Há ainda um aquário, e uma zona de lagos onde habitam répteis e algumas aves. Para além de todas estas áreas existe o Porto D’Abrigo – Centro de Reabilitação de Espécies Marinhas, no qual se recebem espécies autóctones com o objetivo da reabilitação e devolução ao meio natural. O parque tem um Hospital Veterinário, que é composto por um laboratório, uma sala de cirurgia, uma área de internamento (que inclui ainda uma área exterior com uma piscina) e uma farmácia. A equipa, na qual os estagiários são inseridos, é constituída por três médicos veterinários e uma enfermeira veterinária.

Diariamente, no decorrer do estágio, foram acompanhados todos os procedimentos médico-veterinários de rotina, em todas as áreas previamente mencionadas. O trabalho da equipa veterinária no Zoomarine baseia-se no conceito de medicina preventiva, sendo preparado um plano mensal, o qual tem como objetivo monitorizar o estado de saúde de cada um dos animais da coleção. Desta forma, foi possível a participação nas seguintes atividades:

- Procedimentos médicos: colheitas de sangue mensais e vacinações contra *Erysipelothrix rhusiopathiae*, no caso dos golfinhos (*Tursiops truncatus*); e colheitas de sangue trimestrais ou semestrais no caso dos pinípedes; colheita de fezes, urina e de suco gástrico em golfinhos; realização de exame físico a diversas espécies presentes no parque.
- Procedimentos laboratoriais: observação diária de citologias respiratórias e gástricas de golfinhos; processamento de amostras de sangue para hemograma (incluindo a realização de esfregaços sanguíneos para avaliação e contagem diferencial de leucócitos), análises bioquímicas e hormonais; análise de urina e fezes.
- Internamento: acompanhamento de casos clínicos em aves tropicais e de rapina (caturrita – *Myiopsitta monachus*; arara-azul-e-amarela – *Ara ararauna*; goraz – *Nycticorax nycticorax*; coruja-buraqueira – *Athene cunicularia*; entre outros); acompanhamento de um caso clínico de um furão (*Mustela putorius furo*).

- Imagiologia: rastreio radiográfico dentário de golfinhos e num leão-marinho; realização de radiografia em cágados (*Trachemys scripta elegans*, *Trachemys scripta scripta* e *Mauremys leprosa*) e diversas espécies de aves; observação de ecografias de acompanhamento de gestação de golfinhos, no primeiro e segundo trimestre.
- Cirurgia: assistência a cirurgias de extração dentária realizadas nos golfinhos e num leão-marinho-californiano (*Zalophus californianus*).
- Treinos médicos: participação em treinos de comportamentos médicos voluntários, baseados no condicionamento operante, nos quais a cooperação e trabalho de equipa entre treinador e veterinário são fundamentais para garantir o acesso médico aos animais e, assim, monitorizar a saúde destes. É através dos comportamentos médicos que é possível fazer a colheita de amostras, realizar exames físicos e exames complementares de diagnóstico.

Para além dos procedimentos acima referidos, foi possível também participar em vários procedimentos médicos relacionados com as aves da coleção, nomeadamente o *check-up* médico anual, que incluiu colheitas de sangue para monitorização da saúde e rastreio de algumas doenças (exemplos: Clamidiose, Bornavirose), e uma primeira avaliação de aves novas da coleção, incluindo sexagem através de laparoscopia. Foram ainda acompanhados tratamentos antifúngicos de bandos de aves tropicais (*Agapornis fischeri*).

Relativamente aos répteis, foi possível realizar colheitas de sangue e tratamentos de lesões de *shell rott* em cágados de espécies não autóctones (tartaruga-de-barriga-vermelha-da-Flórida – *Pseudemys nelsoni*; tartaruga-da-Flórida – *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys scripta scripta*). Em espécies autóctones pertencentes ao centro de recuperação Porto D'Abrigo (cágado-mediterrânico – *Mauremys leprosa*; cágado-de-carapaça-estriada – *Emys orbicularis*), assistiu-se a um procedimento de amputação de um membro anterior e foram realizadas colocações de sonda esofágica para nutrição enteral. Acompanhou-se também o caso clínico de uma iguana verde (*Iguana iguana*), ao longo dos seis meses de estágio.

No aquário realizou-se observação, tratamento e acompanhamento de diversos casos em várias espécies.

Para além de todos os procedimentos mencionados anteriormente, existiu a oportunidade de participar em diversas necrópsias ao longo do período de estágio, nomeadamente de uma otária-sul-africana (*Arctocephalus pusillus pusillus*), em várias espécies de peixes e algumas aves.

## **2. Estágio no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias e no Laboratório de Anatomia Patológica na FMV-UL**

Entre Maio e Julho de 2015, e novamente em Setembro 2015, foi realizada a parte prática desta dissertação, em dois setores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias e o Laboratório de Anatomia Patológica.

Neste período, no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, foram analisadas cerca de 100 amostras (incluindo fezes e sangue) de pinípedes de três espécies: foca-comum (*Phoca vitulina*), foca-cinzenta (*Halichoerus grypus*) e leão-marinho-californiano (*Zalophus californianus*) e uma subespécie, otária-sul-africana (*Arctocephalus pusillus pusillus*). Para o sangue foram utilizadas a técnica de Knott modificada, o teste rápido para *Dirofilaria* (WITNESS®), e a técnica das fosfatases ácidas em esfregaços sanguíneos. Em relação às fezes foram usadas técnicas coprológicas, como flutuação de Willis, sedimentação em meio saturado, contagem de Ovos por Grama (OPG) pela técnica de McMaster, técnica de Baermann e esfregaço fecal posteriormente corado através da técnica de Ziehl-Neelsen.

A aluna, durante este período, realizou também análises no Laboratório de Anatomia Patológica. Foram executados os cortes de amostras de duas necrópsias de otária-sul-africana (*Arctocephalus pusillus pusillus*), nas quais foram encontrados parasitas no coração e artéria pulmonar, uma das quais presenciada durante o estágio da autora, no Zoomarine. Posteriormente, as lâminas foram observadas e analisadas, identificando as lesões presentes.

## II. INTRODUÇÃO

---

Os mamíferos marinhos, tal como a sua denominação indica, têm as mesmas características que outros animais assim classificados, mas com adaptações para viver toda ou parte da sua vida no meio aquático. Podem dividir-se em três grandes ordens: Cetacea (golfinhos, baleias, botos, narvais, belugas), Carnivora (pinípedes, ursos polares, lontra-marinha) e Sirenia (manatins e dugongos). Os pinípedes, que incluem focas, leões-marinhos e otárias, encontram-se distribuídos um pouco por todo o mundo e passam a maioria da sua vida na água, voltando a terra nas épocas de reprodução e muda (Berta, Sumich, & Kovacs, 2015).

Os humanos têm um grande interesse por animais selvagens e há registo da existência de parques zoológicos considerados modernos, desde o século XVIII (Odell & Wlodarski, 2009). Com o decorrer do tempo e a evolução da ciência, os parques e aquários obtiveram mais conhecimento e passaram a ser um local não só de recreação, mas mais importante, de educação, conservação e investigação científica. Algumas espécies de pinípedes existem em parques zoológicos e são dos mamíferos marinhos que mais surgem em centros de reabilitação. Há cada vez mais, um maior e crescente interesse veterinário na correta gestão das coleções de mamíferos marinhos, o que resulta num maior e mais rápido desenvolvimento da medicina e cuidados especiais para estes animais. O treino dos animais para comportamentos médicos voluntários, por exemplo, é um desses desenvolvimentos, que contribui para estudos realizados em ambiente zoológico, sendo estes um complemento à investigação em ambiente selvagem (Gulland, Haulena, & Dierauf, 2001).

A presente dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária surge no seguimento do estágio curricular da autora no parque oceanográfico “Zoomarine – Mundo Aquático S.A.”

Na sequência de achados de duas necrópsias e dois resultados positivos num rastreio de *Dirofilaria immitis* durante o decorrer do estágio da aluna, decidiu-se prosseguir com um estudo parasitológico da coleção de pinípedes existente no Zoomarine, especialmente porque o parque se situa no Algarve, que é considerada uma zona endémica para alguns parasitas, em particular os transmitidos por vetores. A parasitologia de pinípedes não é uma área exaustivamente estudada. Apesar de vários trabalhos terem sido publicados recentemente a nível mundial, muito falta ainda para descobrir e conhecer. O mesmo ocorre em Portugal, em que os dados existentes sobre parasitas destas espécies são escassos. Assim, a autora propôs-se realizar uma revisão mais atual sobre alguns dos parasitas mais frequentes que infetam pinípedes.

O trabalho realizado insere-se no âmbito da medicina preventiva, que se pratica em ambiente zoológico para mamíferos marinhos, com o objetivo de proporcionar o máximo bem-estar aos animais.

### III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 1. Pinípedes

Os pinípedes são membros da ordem Carnivora, subordem Pinnipedia que engloba mamíferos carnívoros encontrados exclusivamente em habitats aquáticos. Esta subordem inclui três famílias: Otariidae (leões-marinhos e otárias), Phocidae (verdadeiras focas) e Odobenidae (morsas). Trinta e quatro espécies de pinípedes estão distribuídas por todo o mundo: 18 focídeos, 15 otariídeos e a morsa. Com exceção da espécie *Pusa sibirica* e de duas subespécies da espécie *Pusa hispida* (*P. h. ladogensis*, *P. h. saimensis*), que habitam ambientes de água doce, todos os outros pinípedes vivem em ambientes marinhos. Os membros desta subordem são facilmente reconhecidos pela forma fusiforme do corpo e pela adaptação dos seus membros ao meio aquático (Berta, 2009; Van Bonn, 2014).

Das duas famílias, Phocidae e Otariidae, os focídeos são frequentemente denominados como verdadeiras focas e caracterizados pela ausência de pavilhão auricular/orelhas, o que os distingue dos outros grupos de pinípedes. As focas não têm a capacidade de movimentar as barbatanas posteriores em direção cranial para suportar o peso do corpo e deslocar-se, o que resulta numa locomoção semelhante ao rastejar, quando se deslocam em terra. Na sua maioria, as focas distribuem-se pelas regiões polar e subpolar (Berta, 2009).

São reconhecidas duas subfamílias, Monachinae e Phocinae. A subfamília Monachinae divide-se em três tribos: Monachini (focas-monge), Miroungini (elefantes-marinhos) e Lobodontini. No caso da subfamília Phocinae existem sete géneros e dez espécies distintas, demonstradas na Figura 1 (Berta & Churchill, 2012).

Os otariídeos são caracterizados pela presença de pavilhão auricular/orelhas e pela sua capacidade de se levantarem através das barbatanas torácicas e suportar o seu peso, movimentar as barbatanas posteriores em direção cranial e assim caminhar em terra. A família Otariidae está dividida em duas subfamílias: Otariinae (leões-marinhos) e Arctocephalinae (otárias). O que os distingue mais facilmente é a diferença na pelagem. Os leões-marinhos têm uma pelagem curta, que fica completamente lisa contra a pele, quando molhados. As otárias têm uma pelagem mais especializada, com pelos secundários que prendem o ar, sendo este um meio importante de termorregulação (Berta, 2009; Van Bonn, 2014).

São reconhecidos cinco géneros e seis espécies de leões-marinhos, que habitam tanto o Hemisfério Norte como o Hemisfério Sul. As otárias dividem-se em dois géneros: *Callorhinus*, que habita o Hemisfério Norte; e *Arctocephalus*, que habita o Hemisfério Sul (à exceção da espécie *Arctocephalus townsendi*, que habita as ilhas Guadalupe pertencentes ao México). Este último género inclui oito espécies distintas, evidenciadas na Figura 2 (Berta, 2009).

Figura 1 – Esquema ilustrativo das espécies de focídeos existentes a nível mundial.

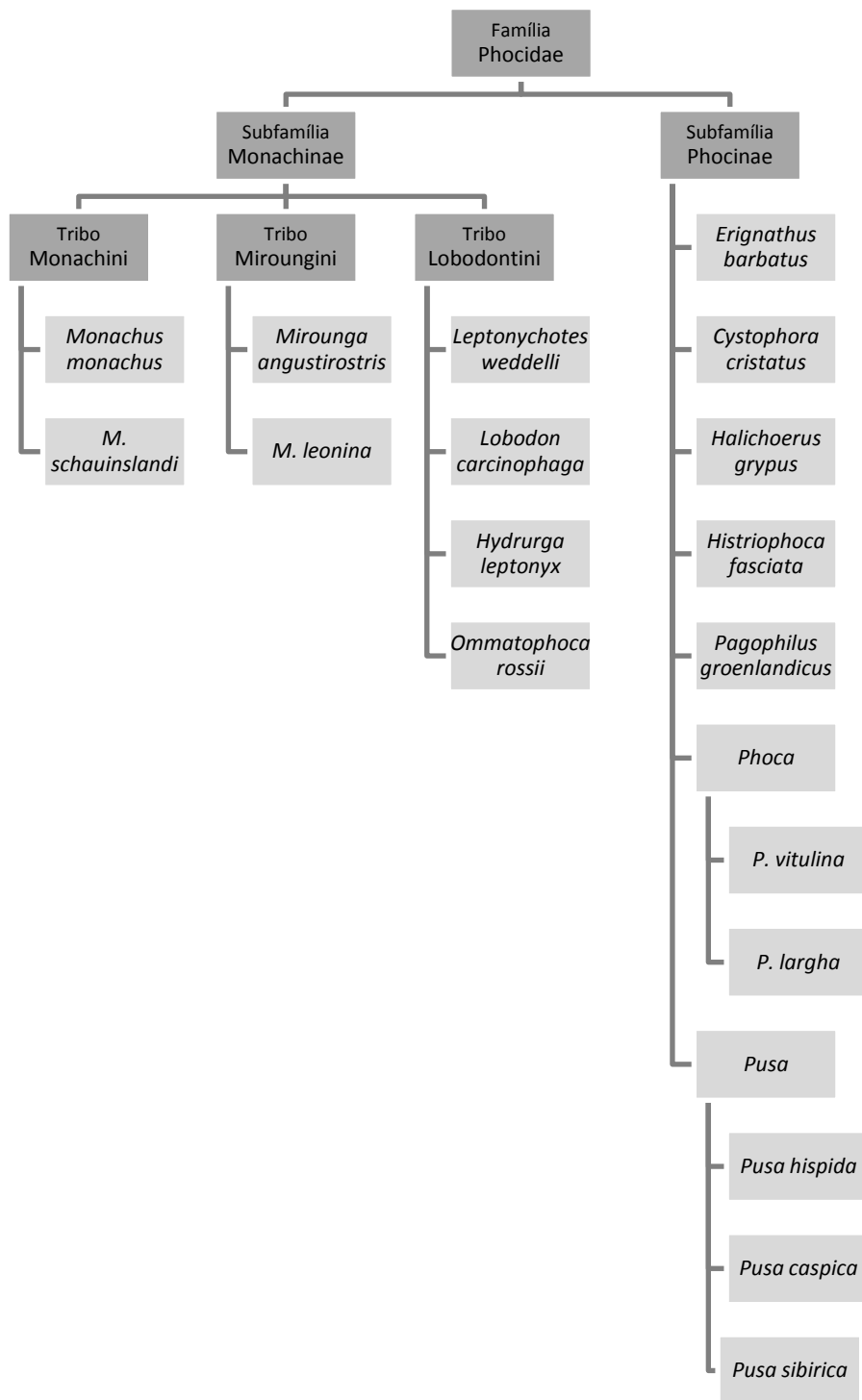
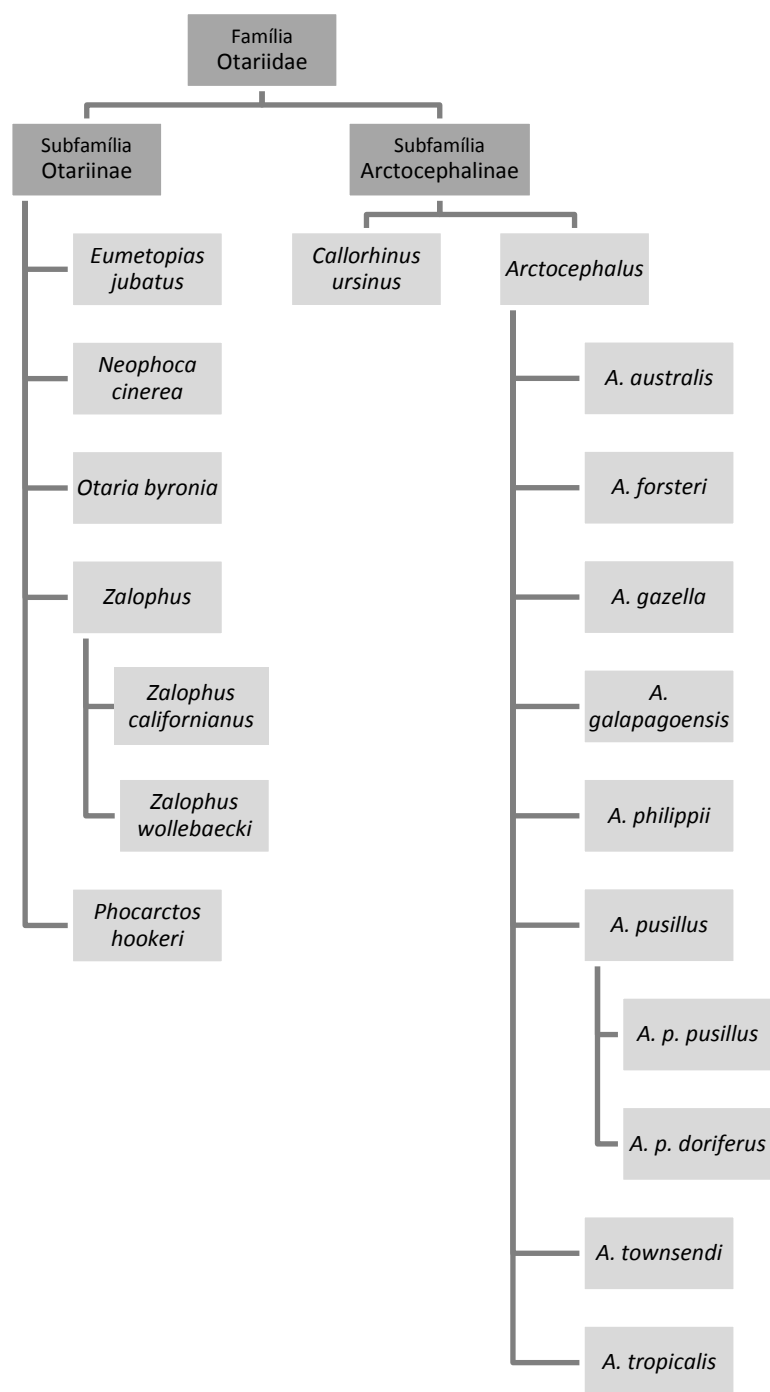


Figura 2 – Esquema ilustrativo das espécies de otariídeos existentes a nível mundial.



No Zoomarine, a coleção de pinípedes é constituída por três espécies e uma subespécie das acima apresentadas. Do grupo dos focídeos, a foca-comum (*Phoca vitulina*) e a foca-cinzenta (*Halichoerus grypus*), e dos otariídeos, o leão-marinho-californiano (*Zalophus californianus*) e a otária-sul-africana (*Arctocephalus pusillus pusillus*).

### 1.1. Foca-comum (*Phoca vitulina*)

A foca-comum (*Phoca vitulina*) (Figura 3) é a espécie de pinípede com uma distribuição mais ampla. Pode encontrar-se esta espécie ao longo das águas costeiras do Hemisfério



Norte, desde zonas temperadas até regiões polares. São reconhecidas cinco subespécies: *P. v. vitulina* que habita o nordeste do oceano Atlântico, *P. v. concolor* no noroeste do oceano Atlântico, *P. v. mellonae* que vive apenas em lagos e rios no norte do Quebec, no Canadá, *P. v. richardii* que se pode encontrar no nordeste do oceano Pacífico e *P. v. stejnegeri* no Pacífico Oeste (Thompson & Härkönen, 2008a).

No que respeita ao seu aspeto físico, os adultos e os juvenis são muito semelhantes, com diferença no seu tamanho. A coloração mais comum da pelagem é um cinzento claro a escuro ou castanho-escuro. O padrão de coloração da pelagem das focas é bastante variável, com presença de manchas espalhadas por toda a superfície corporal, mas em menor número na zona ventral. As manchas são escuras em animais de pelagem mais clara e claras em animais de pelagem mais escura. Os machos adultos podem medir até 1,9 m de comprimento e pesar entre 70 a 150 kg, sendo que as fêmeas podem atingir 1,7 m e 60 a 110 kg. Para além da pequena diferença de tamanho e peso, estes animais têm pouco dimorfismo sexual (Burns, 2009).

Figura 3 – Foca-comum (*Phoca vitulina*) no Zoomarine (cortesia de Raquel Fernandes).



## 1.2. Foca-cinzenta (*Halichoerus grypus*)

Conhecem-se duas subespécies de foca-cinzenta (*Halichoerus grypus*) (Figura 4): *H. g. grypus*, cujo habitat é o norte do oceano Atlântico Este e Oeste; e *H. g. macrorhynchus* no mar Báltico (Thompson & Härkönen, 2008b).

Esta espécie demonstra dimorfismo sexual, podendo pesar os machos adultos entre 170 e 310 kg e as fêmeas adultas entre 100 e 190 kg. O pescoço e peito dos machos são enrugados, enquanto nas fêmeas estes são mais esguios. Ambos os sexos têm um nariz convexo e um focinho alongado, mais evidentes no macho. Os padrões de pelagem são variáveis, mas em geral as fêmeas têm uma coloração cinzenta semelhante a ardósia, com zonas esbranquiçadas, com manchas de cor preta, particularmente na zona do pescoço. Os

machos têm normalmente uma coloração mais uniforme e escura quando adultos, mas os juvenis podem ter uma pelagem semelhante à das fêmeas (Hall & Thompson, 2009).

Figura 4 – Foca-cinzenta (*Halichoerus grypus*) no Zoomarine (cortesia de Raquel Fernandes).



### **1.3. Leão-marinho-californiano (*Zalophus californianus*)**

O habitat do leão-marinho-californiano (Figura 5) situa-se na parte norte e este do oceano Pacífico. Esta espécie tem um dimorfismo sexual marcado. O peso e comprimento de um macho adulto pode atingir os 350 kg e 2,4 m, respetivamente, comparando com as fêmeas adultas que atingem apenas 100 kg e 1,8 m. As crias quando nascem têm uma pelagem castanho-escura ou preta, que muda para um castanho mais claro aos 4-6 meses. As fêmeas mantêm esta cor de pelagem até à idade adulta e nos machos a cor torna-se mais escura. Os machos adultos têm normalmente uma cor castanho-escuro, mas que pode variar entre um castanho mais claro e preto. Todos os animais parecem ter uma pelagem de cor preta quando molhados. A crista sagital que se desenvolve na fronte nos machos adultos é característica desta espécie (Heath & Perrin, 2009).

### **1.4. Otária-sul-africana (*Arctocephalus pusillus pusillus*)**

A otária-sul-africana (Figura 6) é uma de duas subespécies da espécie *Arctocephalus pusillus*. Habita ao longo da costa e ilhas costeiras do sudoeste e sul da África do Sul e Namíbia. A outra subespécie, *Arctocephalus pusillus doriferus*, habita na zona costeira do sul e sudeste da Austrália (Hofmeyr & Gales, 2008).

A cor da pelagem destes animais é geralmente castanho-escuro uniforme e pode variar até cinzento-escuro na superfície dorsal, com uma aparência semelhante à pelagem de um urso pardo, devido à camada mais exterior de pelo ter uma coloração mais pálida. Na zona abdominal destes animais a pelagem adquire uma cor mais clara. Estes animais

demonstram dimorfismo sexual pelas diferenças de tamanho e peso. Os machos e fêmeas adultos pesam em média 247 kg e 57 kg, respectivamente (Arnould, 2009).

Figura 5 – Leão-marinho-californiano (*Zalophus californianus*) no Zoomarine (cortesia de Raquel Fernandes).

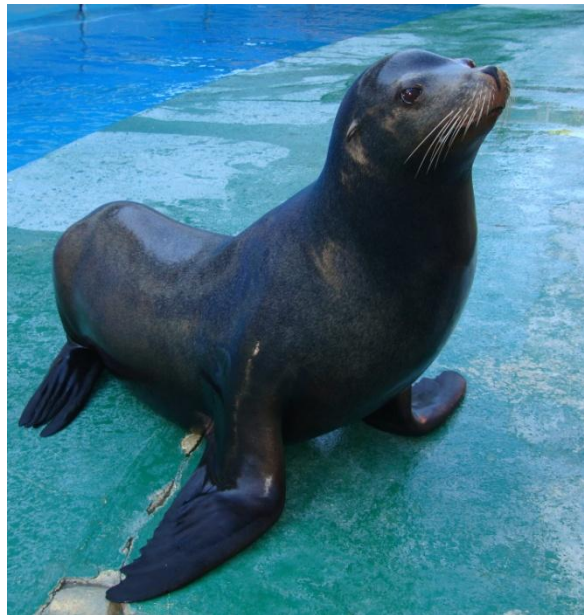


Figura 6 – Otária-sul-africana (*Arctocephalus pusillus pusillus*) (fêmea e macho) no Zoomarine (cortesia de Raquel Fernandes).



## 2. Contexto zoológico

Quando mantidos sob cuidados humanos, devem garantir-se as condições de acordo com as características dos animais e o mais semelhantes possível às encontradas no ambiente natural, com o objetivo de proporcionar o máximo bem-estar a estes animais. Atualmente, isto é possível devido a uma evolução dos cuidados veterinários, à melhoria das instalações onde vivem os animais e de todo o seu manejo e à adoção de uma medicina preventiva.



A longevidade dos pinípedes varia em média, entre os 25 a 30 anos (Berta, 2012). No Zoomarine, existiram otárias sul-africanas que atingiram os 27 anos. Presentemente existem pinípedes de idades variadas, sendo que os animais mais velhos são duas focas-comum com 26 anos e o mais novo, um leão-marinho californiano com 3 anos de idade.

## 2.1. Instalações

Todos os pinípedes requerem sempre acesso a água e uma área seca para descansar. Apesar de ser possível sobreviver sem acesso a água por algumas semanas, não é recomendável, porque a água é essencial para a sua termorregulação. Em ambiente seco, há sempre um maior risco de hipertermia, como tal, devem existir zonas de sombra e aspersores de água (Gulland, Haulena & Dierauf, 2001; Van Bonn, 2014).

A conformação da piscina deve dar resposta às necessidades comportamentais dos animais, assim como à manutenção da qualidade da água. Para os otariídeos, a piscina pode estar acima ou abaixo do nível do chão com acesso através de rampas. As focas necessitam de uma piscina abaixo do nível do chão, nas quais o nível de água tem de estar muito próximo da borda da piscina. As bordas da piscina devem ser ligeiramente inclinadas e terminar abaixo do nível da água, para permitir o descanso das focas em águas pouco profundas e facilitar a saída da piscina. Os habitats fechados na área seca, devem ser construídos com material não tóxico, resistente à corrosão, não abrasivo e devem ter altura suficiente para todas as espécies que vão alojar (Gulland, Haulena & Dierauf, 2001).

Todas as piscinas no Zoomarine têm a mesma conformação: as bordas são inclinadas e ligeiramente abaixo do nível da água, para permitir que a entrada e saída sejam confortáveis para todas as espécies. Em cada recinto com piscina, existe sempre uma área seca com sombra (Figura 7) e bebedouros com água doce sempre à disposição.

Figura 7 – Exemplo de um habitat e piscina na área dos pinípedes no Zoomarine (fonte: Zoomarine).



A manutenção da qualidade da água utilizada nas piscinas é de extrema importância para assegurar o bem-estar e saúde dos animais, porque estes normalmente realizam todas as suas atividades (natação, alimentação, defecação e micção) dentro de água. É necessário ter em conta todas as condições ambientais, tais como, a temperatura, luz, salinidade e pH; cada piscina deve ter um sistema de filtração e esterilização. A água usada pode ser água do mar natural, água salgada artificial ou água doce. Usualmente, apenas se utiliza água doce para molhar os animais, quando estes estão fora de água durante a realização de procedimentos médicos (Arkush, 2001).

No Zoomarine, a água que é utilizada é a salgada artificial. O Laboratório de Águas do Parque realiza análises três vezes por dia a vários componentes da água, como a salinidade, pH, cloro e amónia. Semanalmente, realizam-se análises microbiológicas.

## **2.2. Alimentação**

Os pinípedes são carnívoros, e largamente piscívoros, com uma alimentação bastante variada, que muda sazonalmente e por região. A alimentação de pinípedes consiste em peixe e cefalópodes. No entanto, outros invertebrados são importantes para alguns pinípedes, como por exemplo o *krill* para espécies de focas do Antártico. No Ártico, os crustáceos também fazem parte da alimentação de algumas espécies. Ocasionalmente podem alimentar-se de aves e de outros pinípedes. (Bowen, Beck & Austin, 2009; Berta, Sumich, & Kovacs, 2015).

Em ambiente zoológico esta realidade é diferente. A variedade da dieta dos pinípedes é mais limitada devido a todas as condicionantes comerciais, como a disponibilidade e o custo do peixe. As espécies mais utilizadas são, entre outros, o arenque (*Clupea harengus*), a cavala (*Scomber scombrus*), o capelim (*Mallotus villosus*), a lula (*Loligo spp.*), o bacalhau (*Gadus morhua*) e o smelt (*Osmerus mordax*) (Gulland, Haulena & Dierauf, 2001; Worthy, 2001).

No caso do Zoomarine, os animais são alimentados com as espécies descritas na Tabela 1. A dieta destes animais é programada e realizada em função das quilocalorias (kcal) e não da quantidade de peixe em quilogramas (kg). Como tal, os animais são pesados regularmente para que se possa calcular as quilocalorias necessárias para cada um deles.

Todo o peixe fornecido aos animais provém da pesca, é congelado em alto mar e chega ao parque, inteiro, congelado e embalado. Após a chegada de um novo lote de peixe ao parque, uma amostra é recolhida e enviada para um laboratório externo, no qual se realiza o controlo de qualidade (peróxidos, Azoto básico volátil total – ABVT e Índice do ácido tiobarbitúrico – TBA) e a análise nutricional do peixe pertencente a esse lote.

Tabela 1 – Peixes e cefalópodes que compõem a dieta da coleção zoológica do Zoomarine (adaptado de Santos, 2011).

Denominação Portuguesa	Denominação Inglesa	Nome científico	Categoria
<b>Cavala</b>	Mackerel	<i>Scomber japonicus</i>	Grupo B – peixes azuis ou gordos
<b>Arenque</b>	Herring	<i>Clupea harengus</i>	
<b>Espadilha</b>	Sprat	<i>Sprattus sprattus</i>	
<b>Capelim</b>	Capelin	<i>Mallotus villosus</i>	Grupo A – peixes brancos ou magros
<b>Verdinho</b>	Blue whiting	<i>Micromesistius poutassou</i>	
<b>Carapau</b>	Horse mackerel	<i>Trachurus trchurus</i>	
<b>Lula</b>	Squid	<i>Loligo vulgaris</i>	Grupo D - cefalópodes

Devido às perdas de nutrientes que ocorrem durante a armazenagem e descongelação do peixe, é necessário incluir um suplemento vitamínico e mineral diário na dieta dos mamíferos marinhos (Santos, 2011). No Zoomarine, a alimentação dos pinípedes é complementada com Akwavit®. Este é composto por vitamina A, D, E, B1, B2, B6, B12 e C, ácido pantoténico, ácido fólico, biotina, niacina, ferro, iodo, manganês, zinco, magnésio e inositol. Os comprimidos de Akwavit® são colocados na cavidade branquial do peixe com o tamanho mais pequeno (capelim) e são fornecidas uma hora antes da primeira sessão de alimentação do dia.

### 2.3. Maneio e comportamentos médicos voluntários

No Zoomarine, o trabalho médico-veterinário baseia-se na medicina preventiva. São elaborados planos médicos mensais, nos quais se planeiam todos os procedimentos para monitorizar o estado de saúde dos animais, mesmo que estes não apresentem sinais clínicos. No caso dos pinípedes, são efetuadas colheitas sanguíneas trimestrais ou semestrais, dependendo de animal para animal, para realizar hemograma, análises bioquímicas e hormonais. Todos os procedimentos médicos são realizados através de comportamentos médicos voluntários. Este tipo de treino é realizado com todos os mamíferos marinhos no parque, baseado no condicionamento operante, excetuando as crias e animais jovens que ainda estão em processo de aprendizagem. É uma rotina contínua, na qual veterinários e treinadores trabalham em conjunto, para que quando for necessário realizar um procedimento médico, este decorra com segurança para o animal e todos os intervenientes. Exemplos de treinos médicos são as colheitas sanguíneas, ecografias, radiografias, entubação esofágica para hidratação, colocação de gotas oftálmicas, escovagem de dentes, exame físico, auscultação, entre outros.

Em relação à desparasitação dos pinípedes, presentemente esta não se realiza. No entanto, no passado, os fármacos utilizados eram praziquantel, pamoato de pirantel e febantel (Drontal® Plus e Drontal® Plus XL), na dose de 2,5 mg/kg, uma vez por mês, posologia oral; e também ivermectina e pirantel (Heartgard® Plus), 1 comprimido por cada 45 kg de peso. Todas as doses que eram aplicadas são *off-label*, ou seja, adaptadas de doses formuladas para canídeos domésticos.

O controlo de pragas é realizado por uma empresa certificada que se desloca ao Zoomarine. O parque tem um plano anual de controlo de pragas que inclui o controlo de moscas e mosquitos, realizado com maior periodicidade na época da Primavera e Verão.

### **3. Parasitas observados em Pinípedes**

Como já antes referido, os pinípedes passam grande parte da sua vida fora de água e estão adaptados a ambos os ambientes, terrestres e aquáticos/marinhos. A sua história filogenética demonstra que estes evoluíram de animais terrestres. Isto reflete-se no número de parasitas que os pinípedes têm em comum com carnívoros terrestres. A sua fauna parasitária é muito diversa e inclui endo e ectoparasitas. Os parasitas mais comuns pertencem aos filos Nematoda, Acanthocephala e Platyhelminthes, com as classes Trematoda e Cestoda (Lauckner, 1985; Leidenberger, Harding & Härkönen, 2007).

O estudo dos parasitas de mamíferos marinhos está um pouco atrás dos de animais terrestres, dos de água doce e também de espécies comercialmente importantes. A primeira tentativa de fazer uma revisão foi realizada por Delyamure em 1955 (Dailey, 2005).

Os ciclos de vida dos parasitas que infetam mamíferos marinhos ainda são pouco conhecidos. A maioria das investigações é realizada para anisacídeos devido ao seu impacto na indústria piscatória e na saúde humana (Leidenberger *et al.*, 2007).

#### **3.1. Nemátodes**

O filo Nematoda contém os parasitas mais prejudiciais para pinípedes (Lauckner, 1985). Os nemátodes são helmintes filiformes, cujos sexos são distintos e nos quais há presença de dimorfismo sexual, sendo os machos mais pequenos que as fêmeas. Os seus ciclos de vida caracterizam-se por várias fases larvares (Bowman, 2014).

Os pinípedes são hospedeiros de uma fauna diversa de nemátodes, que inclui seis famílias distintas (Tabela 2). Em grande medida, esta fauna parasitária está relacionada com a pertencente aos carnívoros terrestres. Assim, o ciclo de alguns grupos é dependente de um ambiente terrestre e assemelha-se ao ciclo dos seus equivalentes terrestres (Lauckner, 1985; Dailey, 2001; Raga, Fernández, Balbuena & Aznar, 2009).

Tabela 2 – Nemátodes observados em pinípedes (adaptado de Lauckner, 1985; Bowman, 2014).

Filó: Nematoda			
Ordem	Superfamília	Família	Espécie
Spirurida	Filarioidea	Onchocercidae	<i>Dirofilaria immitis</i>
			<i>Acanthocheilonema spirocauda</i>
			<i>Acanthocheilonema odendhali</i>
Strongylida	Metastrongyloidea	Crenosomatidae	<i>Otostrongylus circumlitus</i>
		Filaroididae	<i>Parafilaroides</i> spp.
	Ancylostomatoidea	Ancylostomatidae	<i>Uncinaria</i> spp.
Ascaridida	Ascaridoidea	Anisakidae	<i>Pseudoterranova</i> spp.
			<i>Contracaecum</i> spp.
			<i>Phocascaris</i> spp.
			<i>Anisakis</i> spp.
Enoplida	Trichinelloidea	Trichinellidae	<i>Trichinella</i> spp.

### 3.1.1. *Dirofilaria immitis*

*Dirofilaria immitis* é um parasita pertencente à superfamília Filarioidea, família Onchocercidae, e caracteriza-se por ser um nemátode filarídeo que parasita o coração direito e artéria pulmonar dos canídeos domésticos. Encontra-se por todo o mundo, em regiões tropicais e temperadas, com humidade suficiente para permitir o desenvolvimento larvar nos principais vetores, os mosquitos culicídeos. Este parasita apresenta uma baixa especificidade de hospedeiros vertebrados, podendo infectar outras espécies de mamíferos para além dos carnívoros domésticos: raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*), raposa-cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*), lobo (*Canis lupus*), lobo-vermelho (*Canis rufus*), coiote (*Canis latrans*), furão (*Mustela putorius*), cavalo (*Equus caballus*), panda-vermelho (*Ailurus fulgens*), leão (*Panthera leo*), leopardo (*Panthera pardus pardus*) e castor (*Castor canadensis*), entre outros. A microfilarémia pode desenvolver-se no cão, gato, lobo-vermelho, coiote, raposa-cinzenta, raposa-vermelha, leão-marinho-californiano e furão. *D. immitis* pode também parasitar acidentalmente o Homem (Anderson, 2001; Alho *et al.*, 2014b).

Este parasita já foi reportado em pinípedes, nomeadamente focas-comuns (*Phoca vitulina*) e leões-marinhos-californianos (*Zalophus californianus*) de parques zoológicos localizados em áreas endémicas, com sinais clínicos e patologia semelhante a *Acanthocheilonema spirocauda* (o nemátode tipicamente encontrado no coração de pinípedes) (Lauckner, 1985; Forrester, Jackson, Miller & Townsend, 1973; Medway & Weiland, 1975; White, 1975; Dailey, 2001; Sato *et al.*, 2002). No entanto, *Dirofilaria immitis* ainda não foi reportado em pinípedes em ambiente selvagem (Forrester *et al.*, 1973; Van Bonn, 2014). Quanto à



localização de *D. immitis* nestes animais, esta é muito semelhante à que ocorre nos cães, tendo sido reportada no ventrículo direito, artéria pulmonar e veia cava (Forrester *et al.*, 1973; Medway & Weiland, 1975; White, 1975; Sato *et al.*, 2002).

Tendo em conta a localização destes parasitas, a insuficiência cardiopulmonar é um dos sinais mais evidentes observado em leões-marinhos-californianos, evidenciando-se através da tosse e respiração irregular. Outros sinais, como a anorexia e perda de peso anterior à morte, foram também verificados. Os hospedeiros podem ser assintomáticos por vários anos e apenas manifestar sinais clínicos devido a parasitismo intenso. As lesões encontradas em necrópsia incluem congestão passiva generalizada (pulmão, fígado e rins) e algum grau de dilatação do coração direito e, em alguns casos, pneumonia intersticial (White, 1975; Dailey, 2001; Sato, 2002).

O ciclo de vida de *D. immitis* é heteroxeno e indireto, o qual inclui um hospedeiro intermediário (HI) e um hospedeiro definitivo (HD). Consiste em cinco estádios larvares, sendo que três ocorrem nos túbulos de Malpighi do HI (artrópodes da família *Culicidae*) e os outros dois num HD vertebrado. As fêmeas de mosquito infetam-se ao alimentarem-se através da picada num HD infetado. As microfilárias vão desenvolver-se até larvas do terceiro estágio (L3 – larvas infetantes) no mosquito. Depois de uma nova alimentação através de picada, as larvas penetram nos tecidos conjuntivos e musculares do hospedeiro definitivo e mudam para L4 e L5. As L5 migram para o coração (câmaras cardíacas direitas) e artérias pulmonares através da circulação venosa. Os adultos podem localizar-se também, na veia cava e na veia hepática. Quando os adultos atingem a maturidade, dá-se a cópula e as fêmeas depositam as pré-larvas L1 ou microfilárias na corrente sanguínea. O macho adulto, com dimensões menores que a fêmea adulta, apresenta a extremidade posterior em forma de espiral (Alho *et al.*, 2014b; Bowman, 2014).

Para o diagnóstico de *D. immitis*, o método mais utilizado em canídeos domésticos é o teste de pesquisa de antigénio de fêmeas adultas. Podem ser obtidos falsos negativos nestes testes, devido a infeções de apenas machos ou baixa carga parasitária. Usualmente utilizam-se mais métodos, como a visualização e identificação de microfilárias no sangue, que no caso de pinípedes é necessário para a distinção entre *D. immitis*, *A. spirocauda* e *A. odendhali*. Para este objetivo existem várias técnicas, tais como, a Técnica da Gota Fresca e o esfregaço sanguíneo para visualização e a Técnica de Knott Modificada e a Técnica das Fosfatases Ácidas para identificação. Para além de técnicas laboratoriais, podem utilizar-se a radiografia torácica, na qual se evidencia o aumento da artéria pulmonar, alterações do parênquima pulmonar e dilatação do coração direito, e a ecocardiografia, que é eficaz para visualização de parasitas adultos (Forrester *et al.*, 1973; Anderson, 2001; Simón *et al.*, 2012; Alho, Meireles, Belo & Madeira de Carvalho, 2014c).

Ainda não está descrito um tratamento bem-sucedido. Em animais em parques zoológicos localizados em zonas endémicas, é recomendado na época dos mosquitos, o tratamento

preventivo de *D. immitis* com ivermectina (0,6 mg/kg), uma vez por mês (Gulland *et al.*, 2001; Dailey, 2001).

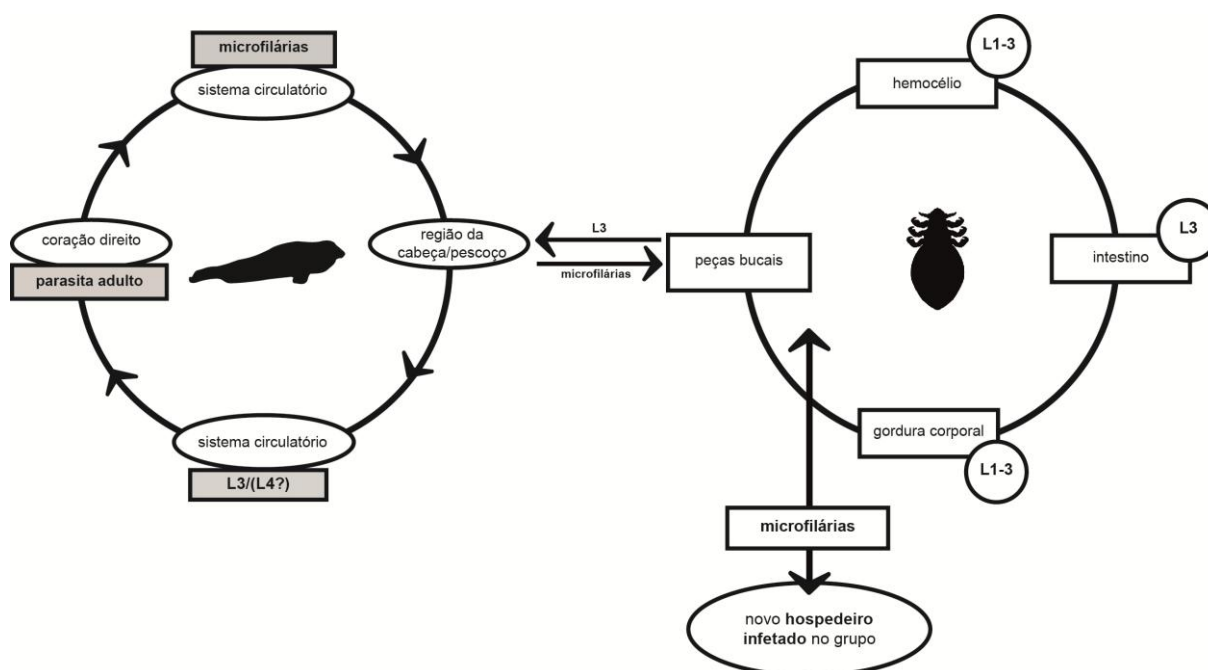
### **3.1.2. *Acanthocheilonema spirocauda***

*Acanthocheilonema spirocauda* (superfamília Filarioidea, família Onchocercidae), descrito pela primeira vez em focas-comuns (*Phoca vitulina*), é um parasita do coração direito e artérias pulmonares de várias espécies de focas. Com uma distribuição holártica e aparentemente limitada ao Hemisfério Norte, este parasita parece ter uma baixa especificidade de hospedeiros dentro dos pinípedes, tendo sido reportado em sete espécies de focas, afetando a subfamília Phocinae (*Pusa hispida*, *Pagophilus groenlandicus*, *Phoca vitulina*, *Phoca largha*, *Histiophoca fasciata*, *Erignathus barbatus*, *Cystophora cristatus*) e Monachinae (*Monachus monachus*) e aparentemente não ocorre em otariídeos (Measures, Gosselin & Bergeron, 1997; Leidenberger *et al.*, 2007; Papadopoulos *et al.*, 2010).

O ciclo de vida deste parasita ainda não é totalmente conhecido. O piolho, *Echinophthirius horridus*, parece desempenhar um papel de hospedeiro intermediário na transmissão de *A. spirocauda* entre focas. Pouco se conhece sobre o papel do piolho sugador como potencial vetor, assim como o seu papel no desenvolvimento e transmissão de *A. spirocauda* ao seu hospedeiro definitivo. No entanto, a detecção de estádios larvares no piolho, apoia a hipótese de que *A. spirocauda* usa potencialmente *E. horridus* como hospedeiro intermediário. Esta premissa baseia-se num estudo (Geraci *et al.*, 1981), no qual foi possível demonstrar o desenvolvimento de três estádios larvares no piolho. Noutros estudos que foram realizados (Taylor *et al.*, 1961; Dunn & Wolke, 1976) não se obteve sucesso. Portanto, outros vetores ainda desconhecidos poderão estar envolvidos na transmissão deste parasita (Leidenberger *et al.*, 2007; Lehnert, Schwanke, Hahn, Wohlsein & Siebert, 2015).

*Echinophthirius horridus* está limitado ao Hemisfério Norte e foi reportado em nove espécies de focídeos, pertencentes a quatro géneros diferentes, incluindo focas de água doce. Em todos os estádios o piolho alimenta-se de sangue, como tal, as ninfas podem, possivelmente, ser também hospedeiros intermediários e não apenas os adultos. As larvas (L1,L2,L3) encontram-se no intestino, hemocélio, peças bucais, e mais frequentemente, na gordura corporal do piolho (Geraci *et al.*, 1981). O quarto estágio desenvolve-se no sistema circulatório das focas e eventualmente, desenvolve-se até à forma adulta, que se aloja no coração e artéria pulmonar (Figura 8). Os piolhos dispersam através do contacto físico entre hospedeiros enquanto estão em terra, quer de maneira vertical ou horizontal (Leonardi *et al.*, 2013). A transmissão transplacentária foi sugerida, mas não é provável que seja importante porque a ocorrência de parasitas em focas adultas é muito rara comparada com juvenis. Para além disso, não se encontraram os três primeiros estádios larvares em focas. (Leidenberger *et al.*, 2007).

Figura 8 – Possível ciclo de vida e vias de transmissão de *Acanthocheilonema spirocauda* em *Phoca vitulina* e *Echinophytirus horridus*. L1-4: primeiro a quarto estágio larvar; L4?: sem descrições detalhadas disponíveis; (traduzido e adaptado de Leidenberger *et al.*, 2007).



Os piolhos são encontrados frequentemente em animais jovens e debilitados, mas raramente em focas adultas saudáveis. *A. spirocauda* infecta primariamente focas no primeiro ano de vida e focas imaturas (com 4 ou menos anos de idade), e depois da infecção a prevalência parece diminuir com o aumento da idade do hospedeiro. A dependência da idade encontrada na prevalência e nível de infecção nos dois parasitas, *A. spirocauda* e *E. horridus*, apoia a ideia de que existe uma associação entre ambos e pode sugerir que a transmissão ocorre horizontalmente entre pinípedes imaturos em terra. Para além disso, o ciclo de vida do piolho está associado com o comportamento do hospedeiro e é limitado pelo tempo que este permanece em terra. Pinípedes imaturos passam mais tempo em terra, portanto os piolhos provavelmente reproduzem-se neles, resultando em infecções mais elevadas (Measures *et al.*, 1997; Leidenberger *et al.*, 2007; Lehnert *et al.*, 2015).

Atribuir sinais clínicos a *A. spirocauda* torna-se difícil, porque os animais podem estar infectados por mais do que um parasita, nomeadamente *Otostrongylus circumlitus* e *Parafilaroides* spp. Os sinais típicos de uma infecção com carga parasitária elevada são anorexia, desidratação, tosse, descarga nasal, dispneia e padrões de respiração irregulares (Measures, 2001). As lesões são observadas normalmente no coração, pulmão e fígado. Geralmente, verifica-se dilatação e hipertrofia do coração direito, endarterite da artéria pulmonar, congestão e edema pulmonar e congestão passiva no fígado (Dunn & Wolke, 1976; Leidenberger *et al.*, 2007). Noutros casos, não existiu um impacto negativo por parte de *A. spirocauda*, na saúde dos animais hospedeiros, nem lesões associadas (Lehnert *et al.*, 2015).

A infecção em animais vivos pode ser confirmada pela presença de microfilárias em esfregaços sanguíneos (Taylor *et al.*, 1961; Lehnert *et al.*, 2015), mas esta técnica pode, por vezes, resultar em falsos negativos. Há pouca informação sobre a morfologia das microfilárias na literatura. Taylor *et al.* (1961), Geraci *et al.* (1981) e Lehnert *et al.* (2015) realizaram a medição das microfilárias e os resultados são semelhantes com uma pequena variância. Foi sugerido pelos autores, que esta variância resulta da diferença nos métodos utilizados para o diagnóstico. Outra técnica usada, à semelhança da utilizada para *D. immitis*, é a Técnica de Knott modificada, e é também possível utilizar técnicas moleculares, realizando a extracção de ADN, amplificando através de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e posterior realização de análise sequencial (Leidenberger *et al.*, 2007; Lehnert *et al.*, 2015).

### **3.1.3. *Acanthocheilonema odendhali***

O nemátode *Acanthocheilonema odendhali*, pertencente à superfamília Filarioidea e família Onchocercidae, descrito pela primeira vez em leão-marinho-californiano (*Zalophus californianus*), é um parasita da fáscia intermuscular e cavidades torácica e abdominal. Para além do leão-marinho-californiano, este parasita já foi reportado em outras duas espécies de otariídeos: *Eumetopias jubatus* e *Callorhinus ursinus* (Perry, 1967; Perry & Forrester, 1971; Forrester *et al.*, 1973).

A sua forma adulta, de modo diferente de *A. spirocauda* e *D. immitis*, não é encontrada no coração, mas as suas microfilárias são encontradas no sangue do hospedeiro (Perry, 1967; Lauckner, 1985; Van Bonn, 2014).

O ciclo de vida deste parasita ainda é desconhecido, no entanto, presume-se que insetos hematófagos sejam hospedeiros intermediários/vetores. A patogenicidade de *A. odendhali* ainda não foi estudada com profundidade, mas este parasita não é considerado muito patogénico (Kuzmina, Kuzmin, Tkach, Spraker & Lyons, 2013; Van Bonn, 2014)

Esta espécie difere de *A. spirocauda* pelo tamanho dos adultos que são mais pequenos (macho: 46 – 64 mm de comprimento, média 54 mm; fêmea: 100 – 150 mm de comprimento, média 118 mm), e os seus esófago e cauda são proporcionalmente mais longos em ambos os sexos, particularmente no macho (Perry, 1967).

As microfilárias de *A. odendhali*, *A. spirocauda* e *D. immitis* são muito semelhantes, mas podem ser diferenciadas através do seu tamanho. A mais pequena é *A. odendhali* (231 – 249 x 3,5 µm) (Perry, 1967), seguido de *A. spirocauda* (203,37–250,38 µm x 4,22–5,93 µm) (Lehnert *et al.*, 2015) e por último, *D. immitis* (285 – 290 x 5,5 µm) (Forrester *et al.*, 1973).

### **3.1.4. *Otostrongylus circumlitus***

*Otostrongylus circumlitus* pertence à superfamília Metastrongyloidea e família Crenosomatidae, é encontrado usualmente nas principais vias aéreas de pinípedes. Com uma distribuição holártica e circumpolar, parasita várias espécies de pinípedes,

pertencentes, maioritariamente, à subfamília Phocinae (*Phoca vitulina*, *Phoca largha*, *Pusa hispida*, *Erignathus barbatus*, *Halichoerus grypus*, *Histiophoca fasciata*, *Pagophilus groenlandicus*, *Cystophora cristatus*), no oceano Atlântico Norte e Pacífico Norte. (Bergeron, Measures & Huot, 1997a; Gosselin, Measures & Huot, 1998). Pode ainda parasitar elefantes-marinhos-do-norte (*Mirounga angustirostris*) (Gulland *et al.*, 1997). Mais recentemente foi reportado este parasita em leão-marinho-californiano (Kelly *et al.*, 2005).

O ciclo de vida deste parasita ainda não é completamente conhecido, mas em geral as formas adultas encontram-se nos pulmões. As extremidades cefálicas penetram na mucosa dos brônquios e bronquíolos cerca de 5 mm, e a extremidade posterior estende-se interiormente no lúmen das vias aéreas, chegando a atingir a traqueia (Onderka, 1989; Bergeron, Measures & Huot, 1997b; Gosselin *et al.*, 1998; Measures, 2001).

As fêmeas adultas são ovovivíparas e libertam larvas de primeiro estágio (L1) nas vias aéreas, que são encontradas no muco. As L1 são também observadas nas fezes, sugerindo que estas são transportadas de forma passiva, subindo a árvore brônquica através da ação mucociliar, sendo deglutidas para o estômago e passando para o ambiente exterior através das fezes. Em solha americana (*Hippoglossoides platessoides*) infetada experimentalmente, as larvas desenvolvem-se até ao terceiro estágio na parede intestinal. A 4°C, a primeira muda ocorre 3 dias após infeção e a segunda muda 56 dias depois. Larvas de primeiro estágio permaneceram vivas em água do mar a 5°C, por 3-6 meses e permaneceram infetantes para o peixe até 23 dias. A infeção experimental com invertebrados (gastrópodes e crustáceos) não foi bem-sucedida. Como as larvas L3 se desenvolvem em peixe, é possível que a transmissão de *O. circumlitus* para os pinípedes ocorra através da alimentação. O desenvolvimento no hospedeiro definitivo ainda é desconhecido (Bergeron *et al.*, 1997a).

Entre espécies da subfamília Phocinae e as outras duas espécies nas quais foi identificada a presença do parasita, existem diferenças na distribuição dos nemátodes e na gravidade da infeção. Geralmente, *O. circumlitus* é encontrado principalmente na traqueia, brônquios e bronquíolos, o que provoca bronquite, broncopneumonia e bronquiolite obstrutiva. Ocasionalmente também pode ser encontrado nas câmaras cardíacas direitas e artérias pulmonares (Onderka, 1989; Bergeron *et al.*, 1997b; Gulland *et al.*, 1997). Ao contrário, em elefante-marinho-do-norte e leão-marinho-californiano, existe uma prevalência mais elevada nas câmaras cardíacas direitas e artérias pulmonares, do que nas vias aéreas. As lesões associadas são mais graves e incluem pneumonia intersticial, trombose vascular pulmonar, arterite grave e, em alguns casos, coagulação intravascular disseminada (CID) (Gulland *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 2005).

A prevalência e intensidade das infeções parasitárias são altamente variáveis entre espécies de pinípedes e entre estudos realizados. Em geral, a prevalência da infeção por *O. circumlitus* é mais elevada em pinípedes jovens, especialmente com menos de 1 ano de

idade (Onderka, 1989). Infecções em adultos são observadas com menor frequência. Em situações no meio zoológico, não há relatos de pinípedes estarem infetados com *O. circumlitus*, devido à congelação a que os peixes dados como alimento são submetidos, que pode matar as larvas deste parasita (Measures, 2001).

O diagnóstico *ante-mortem* baseia-se na identificação de larvas L1 no muco brônquico e nas fezes frescas, utilizando a técnica de *Baermann*. As L1 devem ser distinguidas de outras espécies de vermes pulmonares, tais como, *Parafilaroides decorus* e *P. gymnurus*. As L1 de *O. circumlitus* são mais longas (393 – 469 µm) comparadas com *P. decorus* (240 – 279 µm) e *P. gymnurus* (220 – 304 µm) (Bergeron *et al.*, 1997b; Measures, 2001). A lavagem broncoalveolar, que é um método de diagnóstico utilizado para avaliar a doença pulmonar em animais domésticos, tem também sido utilizada em pinípedes. No entanto, esta técnica não foi exaustivamente descrita como uma ferramenta de diagnóstico viável para estas espécies (Piché, Measures, Bédard, & Lair, 2010).

Em parques zoológicos ou centros de reabilitação, as infecções podem ser tratadas com anti-helmínticos, mas é necessário ter cuidado com a escolha do fármaco e da dose utilizada (Measures, 2001). Um tratamento com ivermectina (0,2 mg/kg PO SID) ou moxidectina (0,2 mg/kg SC SID) demonstrou ser eficaz. Ambos os anti-helmínticos reduziram a excreção larvar em cerca de 99% em 10 dias de tratamento, mas a frequência respiratória e dispneia melhoraram mais rapidamente com o tratamento com moxidectina. Simultaneamente aos anti-helmínticos, foram administrados um broncodilatador (clenbuterol), um agente mucolítico (cloridrato de bromexina), um antibiótico (amoxicilina+ácido clavulânico) e um corticosteroide (prednisolona) (Vercruysse *et al.*, 2003).

Não há relatos de infecções humanas com este parasita. A ingestão de peixes marinhos crus contendo estádios larvares infecciosos, pode ser uma preocupação para os consumidores; no entanto, como as larvas parecem ser restritas aos órgãos viscerais de peixe, é improvável que os humanos ingiram larvas por consumir peixe cru (Measures, 2001).

### **3.1.5. *Parafilaroides (Filaroides) spp.***

O género *Parafilaroides*, pertencente à superfamília Metastrongyloidea e família Filaroididae, compreende dois subgéneros de vermes pulmonares, *Filaroides* em carnívoros, primatas e marsupiais australianos, e *Parafilaroides* em mamíferos marinhos. Estes subgéneros eram distinguidos pelas espículas de tamanho menor e pela ausência de papilas caudais em *Parafilaroides*. No entanto, as papilas caudais estão presentes neste subgénero como demonstrado em vários estudos. Outras características encontradas não apoiam a manutenção de *Parafilaroides* como um subgénero de *Filaroides*, sendo que foi proposto restabelecer este subgénero a um *status* genérico completo em Filaroididae (Dailey, 2006). São reconhecidas sete espécies que infetam estes animais: *Parafilaroides gymnurus*, *P. decorus*, *P. hydrurgae*, *P. hispidus*, *P. measuresae*, *P. gullandae* e *P. normani* (Tabela 3)

(Dailey, 2009). Por último, *P. (F.) caspicus* é considerado uma espécie *inquirenda* (devido ao seu isolamento geográfico no mar Cáspio) (Gosselin & Measures, 1997; Measures, 2001; Dailey, 2006). Todas as espécies de *Parafilaroides* são de pinípedes do Hemisfério Norte, exceto *P. hydrurgae*, que foi reportado em foca-leopardo (*Hydrurga leptonyx*), e *P. normani* em três espécies de otariídeos, no Hemisfério Sul. Também, à exceção de *P. decorus* e *P. normani*, todas as outras espécies de *Parafilaroides* parasitam pinípedes da família Phocidae (Dailey, 2006; Dailey, 2009).

Tabela 3 – Espécies de *Parafilaroides* spp. e respectivos hospedeiros identificados (adaptado de Measures, 2001; Dailey, 2006; Dailey, 2009).

Parasita	Hospedeiro
<i>Parafilaroides gymnurus</i>	<i>Phoca vitulina vitulina</i> <i>Pusa hispida</i> <i>Pagophilus groenlandicus</i> <i>Phoca largha</i> <i>Halichoerus grypus</i> <i>Erignathus barbatus</i> <i>Pusa sibirica</i>
<i>P. decorus</i>	<i>Zalophus californianus</i> <i>Callorhinus ursinus</i> <i>Eumetopias jubatus</i>
<i>P. hydrurgae</i>	<i>Hydrurga leptonyx</i>
<i>P. hispidus</i>	<i>Halichoerus grypus</i> <i>Pusa hispida</i>
<i>P. measuresae</i>	<i>Mirounga angustirostris</i>
<i>P. gullandae</i>	<i>Phoca vitulina richardii</i>
<i>P. normani</i>	<i>Arctocephalus pusillus doriferus</i> <i>A. forsteri</i> <i>A. tropicalis</i>

O ciclo de vida destes parasitas não é bem conhecido. *Parafilaroides decorus* em leão-marinho-californiano é o único que tem um ciclo de vida conhecido, tendo sido demonstrado experimentalmente que um peixe (do inglês *Opaleye* – *Girella nigricans*) é o seu hospedeiro intermediário. Fêmeas adultas são ovovíparas e libertam L1 nas vias aéreas. Como as larvas são encontradas no muco e nas fezes dos pinípedes, presume-se que as larvas são transportadas passivamente através da ação mucociliar pela árvore brônquica, sendo deglutidas para o estômago e, através das fezes, são eliminadas para o ambiente. A nível experimental em *G. nigricans*, a primeira muda ocorreu na mucosa e submucosa da parede intestinal 12-15 dias pós infecção (dpi), e larvas L2 foram observadas na camada muscular longitudinal do intestino, após 18 dias de infecção. A segunda muda ocorreu 24-36 dpi, sendo encontradas larvas L3 na camada serosa ou no tecido adiposo mesentérico. Para perceber se o peixe poderia servir de hospedeiro de transporte, alimentaram-se *G. nigricans* não expostos ao parasita com intestinos de *G. nigricans* infetados e passados 14 dias não foram

encontradas larvas. Um leão-marinho-californiano, cujas fezes eram negativas para *P. decorus*, foi alimentado com *G. nigricans* experimentalmente infetado, e 21 dpi surgiram larvas L1 nas fezes (Dailey, 1970).

Todas as espécies de *Parafilaroides* são encontradas por todo o parênquima pulmonar, estando geralmente nos alvéolos, formando por vezes nódulos que contêm mais do que um parasita (Onderka, 1989; Gosselin *et al.*, 1998; Measures, 2001).

Como referido anteriormente, atribuir sinais clínicos a um parasita pode ser difícil, devido à presença de infeções mistas que podem incluir outros vermes pulmonares, tais como *O. circumlitus*, ou vermes do coração, *A. spirocauda*. Bronquite supurativa leve a grave, bronquiolite, peribronquiolite, broncopneumonia, edema pulmonar, atelectasia e enfisema multifocal, microabcessos múltiplos e granulomas são as lesões que estão associadas a estes parasitas (Fleischman & Squire, 1970; Garner *et al.*, 1997; Measures, 2001).

Dados de prevalência e intensidade devem ser interpretados com cuidado, porque estes parasitas são difíceis de remover dos tecidos e alguns estudos baseiam-se apenas em dados histológicos. À diferença de *O. circumlitus*, as infeções por *Parafilaroides* são distribuídas mais uniformemente em todas as classes de idade de pinípedes (Onderka 1989; Gosselin *et al.*, 1998; Measures, 2001).

Em animais vivos, a infeção é determinada através de exame de fezes ou muco pulmonar/nasal para identificação de larvas L1, através da técnica de *Baermann* modificada (Bergeron *et al.*, 1997b; Measures, 2001). Devido à sua localização, os vermes são difíceis de extrair intactos, assim, numa situação *post-mortem*, realizam-se cortes de pulmões congelados e removem-se os parasitas cuidadosamente, utilizando o microscópio estereoscópico e procede-se à classificação morfológica (Gosselin *et al.*, 1998; Dailey, 2009).

Animais com exames fecais positivos para larvas de vermes pulmonares, foram tratados com ivermectina 0,2 mg/kg uma vez, a cada 10-14 dias, até os resultados serem negativos. Animais cujas fezes continham maior número de larvas por campo, foram tratados com ivermectina e dexametasona para reduzir a inflamação causada pelos nemátodes. A dose inicial de dexametasona foi 0,2-0,4 mg/kg SID, durante 2-4 dias. A dose foi diminuída para 0,1-0,2 mg/kg, por 2-4 dias e reduzida novamente para 0,05-0,1 mg/kg, por 2-6 dias, num total de 6-14 dias de tratamento. A dose de dexametasona e a duração do tratamento foi baseado na gravidade dos sinais clínicos e no número de parasitas encontrados durante os exames fecais (Gage, Gerber, Smith & Morgan, 1993). Um tratamento contra *P. gymnurus* realizado com uma única dose de ivermectina (0,2 mg/kg PO) ou moxidectina (0,2 mg/kg SC) demonstrou ser eficaz. No entanto, a eficácia é menor contra *P. gymnurus* comparando com *O. circumlitus*. Juntamente aos anti-helmínticos, foram administrados um broncodilatador, um agente mucolítico, um antibiótico e um corticosteroide (Vercruysse *et al.*, 2003).



À semelhança de *O. circumlitus*, não há relatos de infecções humanas com este parasita. Dada a localização das larvas nos órgãos viscerais de peixe, é improvável que os humanos ingiram larvas por consumir peixe cru (Measures, 2001).

### 3.1.6. Anisakidae

O grupo de nemátodes mais difundido em pinípedes pertence à família Anisakidae (superfamília Ascaridoidea). Dentro desta família, os pinípedes são os hospedeiros primários para espécies de *Pseudoterranova* e *Phocascaris*, sendo que espécies de *Contracaecum* aparecem principalmente em aves aquáticas, embora algumas espécies ocorram em focídeos e otariídeos. *Anisakis* parasita habitualmente cetáceos, mas pode infectar também pinípedes. Usualmente é apenas encontrado em estádios que raramente amadurecem (Dailey, 2001; Dailey, 2005; Raga *et al.*, 2009; Measures, 2014). Estes nemátodes estão amplamente distribuídos no ambiente marinho, mas a maioria dos relatos são feitos no Hemisfério Norte e provavelmente reflete o interesse na investigação (Measures, 2014). Os hospedeiros definitivos de espécies de *Pseudoterranova* conhecidas estão ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Hospedeiros definitivos presentemente identificados, por marcadores genéticos moleculares, para *Pseudoterranova* spp de pinípedes (adaptado de Mattiucci & Nascetti, 2008).

Espécies de <i>Pseudoterranova</i>	Hospedeiro	Zona geográfica
<i>Pseudoterranova decipiens sensu stricto</i>	<i>Phoca vitulina</i>	Nordeste do Pacífico; Nordeste, Noroeste do Atlântico
	<i>Halichoerus grypus</i>	Nordeste, Noroeste do Atlântico
	<i>Cystophora cristatus</i>	
	<i>Zalophus californianus</i> <i>Mirounga angustirostris</i>	Nordeste do Pacífico
<i>Pseudoterranova decipiens E</i>	<i>Leptonychotes weddellii</i>	Antártica
<i>Pseudoterranova azarasi</i>	<i>Zalophus californianus</i>	Nordeste do Pacífico
	<i>Phoca vitulina</i>	
	<i>Eumetopias jubatus</i>	Noroeste do Pacífico, Mar do Japão
	<i>Erignathus barbatus</i>	
<i>Pseudoterranova bulbosa</i>	<i>Erignathus barbatus</i>	Nordeste do Pacífico; Nordeste, Noroeste do Atlântico, Mar Labrador
<i>Pseudoterranova cattani</i>	<i>Otaria byronia</i>	Sudeste do Pacífico
<i>Pseudoterranova krabbei</i>	<i>Phoca vitulina</i>	Nordeste do Atlântico
	<i>Halichoerus grypus</i>	

Presentemente, o género *Contracaecum* inclui cerca de 50 espécies nominais, a maioria das quais parasita aves piscívoras e algumas também pinípedes (Mattiucci & Nascetti, 2008). As espécies que têm pinípedes como hospedeiro definitivo estão demonstradas na Tabela 5. Do género *Phocascaris* fazem parte duas espécies, *P. phocae* e *P. cystophorae* (Mattiucci & Nascetti, 2008).

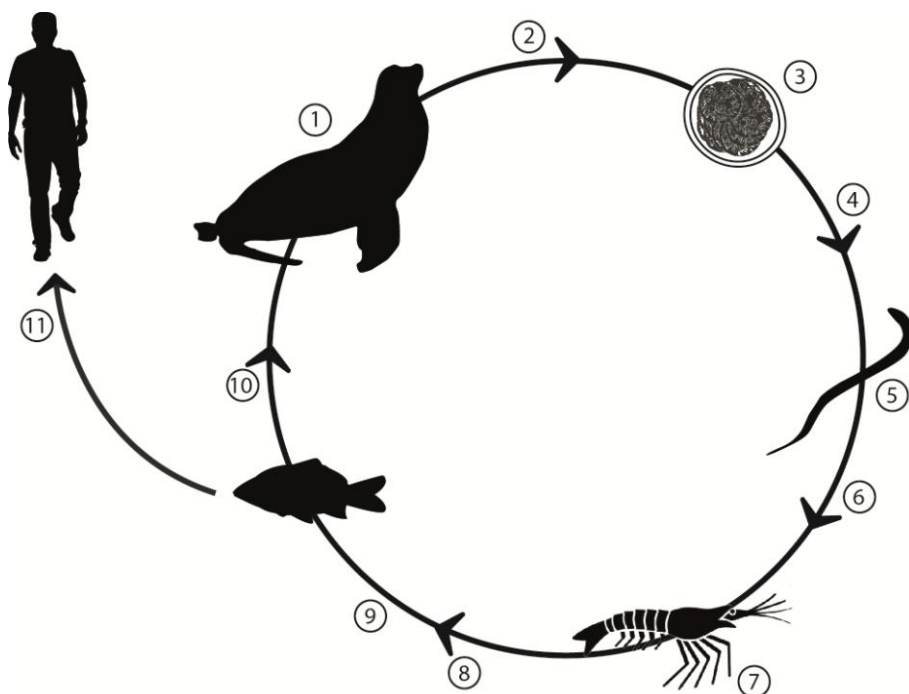
Tabela 5 – Hospedeiros definitivos presentemente identificados, por marcadores genéticos moleculares, para *Contracaecum* spp. de pinípedes (adaptado de Mattiucci & Nascetti, 2008)

Espécies de <i>Contracaecum</i>	Hospedeiro	Zona geográfica
<i>Contracaecum osculatum A</i>	<i>Erignathus barbatus</i>	Nordeste do Pacífico; Noroeste, Nordeste do Atlântico; Mar do Japão; Mar de Barents
	<i>Halichoerus grypus</i>	Noroeste, Nordeste do Atlântico
<i>Contracaecum osculatum B</i>	<i>Phoca vitulina</i>	Noroeste do Atlântico; Nordeste do Pacífico; Mar do Japão; Mar de Bering
	<i>Pagophilus groenlandicus</i>	Nordeste, Noroeste do Atlântico; Mar do Japão; Mar de Bering
	<i>Erignathus barbatus</i>	Mar de Barents
	<i>Eumetopias jubatus</i>	Nordeste do Pacífico
	<i>Halichoerus grypus</i>	Noroeste, Nordeste do Atlântico
	<i>Cystophora cristatus</i>	Noroeste do Atlântico
<i>Contracaecum osculatum (s.s)</i>	<i>Halichoerus grypus</i>	Nordeste, Noroeste do Atlântico; Mar de Barents; Mar Báltico
<i>Contracaecum osculatum D</i>		
<i>Contracaecum osculatum E</i>	<i>Leptonychotes weddellii</i>	Mar de Ross; Mar de Weddell
<i>Contracaecum radiatum</i>		
<i>Contracaecum o. baicalensis</i>	<i>Pusa sibirica</i>	Lago Baikal
<i>Contracaecum mirounga</i>	<i>Mirounga leonina</i>	Antártica
	<i>Arctocephalus australis</i>	Costa Argentina
<i>Contracaecum ogmorhini (s.s.)</i>	<i>Arctocephalus australis</i>	Costa Argentina
	<i>Arctocephalus pusillus</i>	Atlântico Sul (Costa Africana); Costa Australiana
<i>Contracaecum margolisi</i>	<i>Zalophus californianus</i>	Nordeste do Pacífico

Os ciclos de vida desta família de parasitas são complexos e envolvem três hospedeiros marinhos (invertebrados, peixes e mamíferos marinhos). O ciclo de vida de *Pseudoterranova decipiens* (Figura 9) é semelhante ao de *Anisakis* spp., sendo que, em vez de utilizar espécies pelágicas como HI, envolve espécies bênticas. *Pseudoterranova* spp. reproduz-se no estômago de pinípedes. As fêmeas adultas produzem ovos, que são eliminados para o

oceano através das fezes do HD. É necessário um período de desenvolvimento no mar, para que haja a eclosão das larvas. Estas larvas fixam-se à areia ou rochas pelas suas caudas e são ingeridas por um primeiro HI (pequenos crustáceos: *Amphipoda*, *Mysida*, *Isopoda*, *Copepoda*). Os invertebrados infetados são subsequentemente ingeridos por um segundo HI como um pequeno peixe bêntico (exemplo: bacalhau juvenil, smelt). Por predação, estes peixes infetados são ingeridos por peixes bênticos maiores, como bacalhau e tamboril, que podem acumular grandes números de larvas infetantes. Neste momento, as larvas já realizaram duas mudas e são infetantes para pinípedes (HD), e assim, o ciclo completa-se quando estes se alimentam de peixe com larvas infetantes (Raga *et al.*, 2009; Measures, 2014).

Figura 9 – Ciclo de vida de *Pseudoterranova decipiens* (adaptado de Measures, 2014).



Legenda:

1. Parasitas adultos no estômago do hospedeiro definitivo (pinípedes);
2. Excreção de ovos nas fezes;
3. Desenvolvimento das larvas no ovo na água;
4. Eclosão da larva na água;
5. Larva (L2) fixa no solo (areia ou rocha);
6. L2 ingerida por pequenos crustáceos;
7. Maturação de L2 para L3 no crustáceo;
8. Crustáceos ingeridos por peixes bênticos;
9. Larvas infetantes (L3) no tecido muscular do hospedeiro intermediário (peixe);
10. Ingestão de peixe parasitado pelo hospedeiro definitivo (pinípedes);
11. Ingestão de peixe parasitado e cru/mal cozinhado por hospedeiros acidentais (Homem).

A intensidade da infecção no estômago dos pinípedes, pode ser elevada sem provocar sinais clínicos, embora ambas as fases adultas e larvares de anisaquídeos estejam associadas a

sinais clínicos, incluindo gastrite, ulceração gástrica, enterite, diarreia, anemia e, raramente, perfuração gástrica (Dailey, 2001; Measures, 2014).

O diagnóstico em vida baseia-se na detecção de ovos nas fezes dos hospedeiros definitivos (Dailey, 2001). Pode realizar-se a identificação morfológica dos parasitas e a distinção entre géneros, baseadas essencialmente, na morfologia do sistema digestivo do parasita, utilizando microscopia ótica. Um método de investigação eficaz para detetar e obter larvas vivas de invertebrados ou peixes infetados é a digestão artificial seguida de filtração através de um aparelho de Baermann (Measures, 2014).

Esta família de nemátodes é zoonótica e tem importância médica e económica, que pode resultar em custos consideráveis na indústria do peixe. As larvas no peixe residem usualmente no músculo, mas podem também ser encontradas na parede intestinal, fígado e cavidade corporal dos peixes HI. Os humanos são hospedeiros acidentais, infetando-se através do consumo de peixe cru ou mal cozinhado. Os sintomas são agudos na forma gástrica da doença, com dor abdominal intensa, náusea e vômito. Na forma intestinal observa-se dor abdominal menos intensa, náusea e vômito, diarreia ou obstipação e sangue oculto nas fezes. Em muitos casos, a infeção pode não provocar sintomas, mas com uma crescente popularidade do *sushi*, *sashimi* e outros pratos culinários com base no consumo de peixe cru ou mal cozinhado, é importante prevenir a doença. Assim, o peixe deve ser manipulado corretamente. A investigação demonstrou que a congelação comercial rápida de peixe infetado, durante pelo menos 15 horas a -35°C, poderá matar as larvas. No entanto, a sobrevivência das larvas no músculo depende da massa do peixe que está a ser submetido a congelação. Para além da congelação, cozinhar o peixe até atingir uma temperatura de 60-63°C internamente, durante alguns minutos, é suficiente para matar as larvas (Measures, 2014).

### 3.1.7. Ancylostomatidae

Os membros da família Ancylostomatidae constituem um grupo de nemátodes que infecta o trato gastrointestinal de pinípedes, em particular o intestino delgado. Nesta família, os pinípedes são parasitados pelo género *Uncinaria* (Dailey, 2001).

Já foram reportados casos de *Uncinaria* spp., em ambos os hemisférios, em 11 espécies de otariídeos (*Arctocephalus pusillus*, *Arctocephalus philippi*, *Arctocephalus forsteri*, *Callorhinus ursinus*, *Arctocephalus australis*, *Neophoca cinerea*, *Zalophus californianus*, *Phocarcos hookeri*, *Otaria flavescens*, *Eumatopias jubatus*, *Zalophus wolfebaeki*) e em 4 espécies de focídeos (*Mirounga angustirostris*, *Mirounga leonina*, *Phoca hispida*, *Monachus monachus*) (Lyons *et al.*, 2011b; Nadler *et al.*, 2013; Brock *et al.*, 2013; Marcus, Higgins, Šlapeta & Gray, 2014).

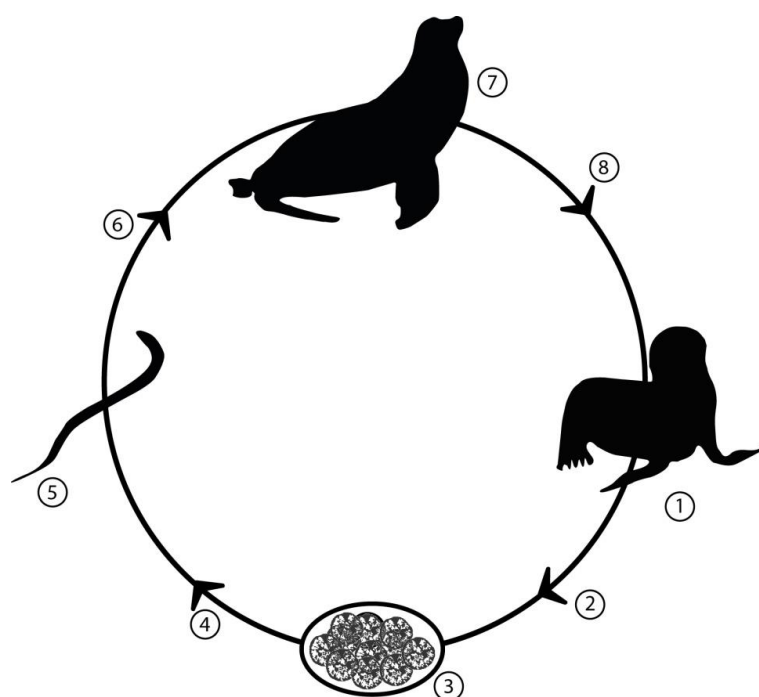
Apesar de existirem bastantes relatos destes parasitas em pinípedes juvenis, a investigação da sua sistemática tem sido limitada, como tal, apenas quatro espécies estão descritas:

*Uncinaria lucasi*, *U. hamiltoni*, *U. sanguinis* e *U. lyonsi* n. sp. (Nadler et al., 2013; Marcus et al., 2014; Kuzmina & Kuzmin, 2015).

*U. lucasi* tem como hospedeiros definitivos as espécies *Callorhinus ursinus* e *Eumetopias jubatus*; *U. hamiltoni*, tem como HD as espécies *Otaria byronia* e *Arctocephalus australis*; *Neophoca cinerea* é parasitado por *U. sanguinis*; e *U. lyonsi* n. sp. parasita *Zalophus californianus* (Nadler et al., 2013; Marcus et al., 2014; Kuzmina & Kuzmin, 2015).

O ciclo de vida de *U. lucasi* (Figura 10) inicia-se quando as crias recém-nascidas se infetam através da amamentação, devido à presença de larvas L3 infetantes no leite da mãe (transmissão transmamária). Depois de ingeridas as larvas através do leite, estas maturam no intestino da cria, durante cerca de 2 semanas, sendo eliminados os seus ovos para o meio ambiente, através das fezes. No solo, as larvas maturam dentro do ovo, apenas eclodindo no terceiro estágio (L3). As larvas L3 infetam os pinípedes adultos através da pele, na qual penetram usualmente nas barbatanas, mas também pode existir infecção oral. De seguida, as larvas migram para os tecidos parenterais, especialmente para a gordura corporal ventral e glândulas mamárias (Dailey, 2005; Raga et al., 2009; Lyons et al., 2011b).

Figura 10 – Ciclo de vida de *Uncinaria lucasi* (adaptado de Dailey, 2005).



Legenda:

1. Parasitas adultos no intestino do hospedeiro definitivo (cria de pinípedo);
2. Excreção de ovos não embrionados nas fezes;
3. Desenvolvimento do ovo no solo;
4. Desenvolvimento das larvas (L1, L2, L3) no ovo;
5. Larva infetante (L3) eclode do ovo;
6. L3 penetra na pele do hospedeiro definitivo (pinípedo adulto);
7. L3 migra para as glândulas mamárias do hospedeiro definitivo;
8. Transmissão transmamária ao hospedeiro definitivo (cria de pinípedo).

O ciclo completa-se aquando do nascimento da cria e sua amamentação. A única forma de excreção das larvas pelo hospedeiro adulto é através do leite, e as L3 livres no ambiente que penetrem na pele de uma cria, não se desenvolvem até à fase adulta. A transmissão ocorre apenas na época reprodutiva; as larvas infetantes hibernam no solo das colónias de pinípedes até à chegada dos hospedeiros. Depois da época de reprodução, as fêmeas infetadas vão para o mar até à próxima primavera quando voltam para terra, no fim da gestação e começa um novo ciclo (Dailey, 2005; Raga *et al.*, 2009; Lyons *et al.*, 2011b).

A família Ancylostomatidae tem uma particularidade morfológica que é a cápsula bucal globosa com ganchos ou lâminas cortantes e, desta forma, fixam-se à mucosa intestinal do hospedeiro, alimentando-se de sangue (hematófagos) (Bowman, 2014).

A lesão mais comum é a anemia crónica numa cria relativamente bem nutrida. As lesões incluem também uma enterite hemorrágica moderada, caracterizada por regiões multifocais de hipertrofia na parede intestinal, lesões multifocais pálidas no fígado, e ocasionalmente uma dilatação do coração. O lúmen do intestino pode conter sangue. Noutras situações, o parasita pode penetrar a parede intestinal e provocar peritonite e bacteriemia (Lyons *et al.*, 2011a, 2011b).

O diagnóstico desta parasitose é realizado pela deteção de ovos nas fezes (Dailey, 2001). Pode realizar-se a identificação morfológica dos parasitas adultos numa situação *post-mortem*, para a distinção entre espécies de *Uncinaria*, que deve ser confirmada através de técnicas moleculares (Marcus *et al.*, 2014; Kuzmina & Kuzmin, 2015).

Em relação a possíveis tratamentos, leões-marinhos juvenis da espécie *Eumatopias jubatus* foram tratados com sucesso com febendazol a 50 mg/kg, durante 4 dias. Leões-marinhos-californianos, focas-comuns e elefantes-marinhos-do-norte foram tratados com sucesso com febendazol a 10 mg/kg, durante 3 dias consecutivos, ou ivermectina a 200 µg/kg, em duas administrações com 10 dias de intervalo (Dailey, 2001). Uma administração subcutânea de ivermectina numa única dose (200 µg/kg), a crias de elefantes-marinhos-do-norte com cerca de 2 semanas, demonstrou uma diminuição significativa da infeção e um aumento no crescimento e taxa de sobrevivência, quando comparadas com um grupo controlo submetido a placebo (DeLong, Orr, Jenkinson & Lyons, 2009).

### **3.1.8. *Trichinella* spp.**

Pertencente à família *Trichinellidae*, o género *Trichinella* foi reportado, de forma pouco frequente, em duas espécies de focídeos: *Erignathus barbatus* e *Pusa hispida*. O parasita que foi isolado em mamíferos marinhos pertence à espécie *Trichinella nativa*, sendo também infeccioso para o homem (por exemplo, o povo *Inuit* que se alimenta de carne de mamíferos marinhos). Este nemátode em mamíferos marinhos tem uma distribuição circumpolar no Ártico e é encontrado com grande frequência em ursos-polares (*Ursus maritimus*) e morsas (*Odobenus rosmarus*). A infeção de pinípedes ocorre, provavelmente, através da exposição

a carcaças infetadas, ou pelo consumo de pequenos crustáceos ou peixe, que se alimentaram de carcaças infetadas (Forbes, 2000).

A infecção experimental de focas da espécie *Halichoerus grypus* com *T. nativa* foi bem-sucedida. Nas focas em que se encontrou menor densidade larvar, os grupos musculares com maior irrigação sanguínea foram os mais afetados: diafragma, músculos intercostais e músculos das barbatanas posteriores (Kapel, Measures, Møller, Forbes, & Gajadhar, 2003).

### 3.2. Céstodes

Pertencente ao filo Platyhelminthes, a classe Cestoda é constituída por helmintes de corpo achatado e tem ambos os sexos representados no mesmo indivíduo. Os adultos são essencialmente uma cadeia (estróbilo) de vários segmentos reprodutivos independentes (proglotes), e na sua extremidade anterior existe um órgão de fixação, o escólex (Bowman, 2014).

Os pinípedes podem ser parasitados, principalmente, por duas famílias de céstodes: Diphylobothriidae (Ordem Pseudophyllidea) e Tetrabothriidae (Ordem Cyclophyllidea) (Dailey, 2001).

Da família Diphylobothriidae, existem cerca de 19 espécies no Hemisfério Norte e 15 espécies no Hemisfério Sul, do género *Diphylobotrium*. Estes números podem não ser totalmente corretos, pois é possível que existam sinónimos de espécies, devido à identificação incorreta de algumas espécies de parasitas (Lauckner, 1985). Desta mesma família, são reportados ainda os seguintes géneros: *Pyramicocephalus* e *Diplogonoporus*, no Hemisfério Norte; *Baylisia*, *Baylisiella* e *Glandicephalus* em pinípedes na Antártida (Lauckner, 1985; Raga *et al.*, 2009).

Da família Tetrabothriidae, apenas o género *Anophryocephalus* está associado com pinípedes, na região holártica. Pequenos crustáceos e peixe parecem ser os hospedeiros intermediários e de transporte, respetivamente, no ciclo de vida destes parasitas (Lauckner, 1985; Raga *et al.*, 2009).

Os membros do género *Diphylobothrium* são os mais reportados em pinípedes. Os parasitas adultos encontram-se no intestino e podem encontrar-se formas larvares (plerocercoides) encapsuladas, em vários locais do organismo de pinípedes, usualmente na gordura subcutânea (Lauckner, 1985).

Os céstodes são parasitas comuns em pinípedes, no entanto, a sua ecologia, especificidade de hospedeiros, prevalência e distribuição ainda não são completamente conhecidas, assim como, os seus ciclos de vida nestes hospedeiros. No entanto, assume-se que utilizem pequenos crustáceos como primeiro hospedeiro intermediário e peixe como segundo hospedeiro intermediário (Kuzmina *et al.*, 2015).

As infeções por céstodes em pinípedes podem atingir níveis elevados de parasitismo, sem grande impacto na saúde do hospedeiro. As lesões, quando presentes, são

maioritariamente atribuídas a obstrução intestinal, ação irritativa e inflamatória e migração para locais não usuais. O diagnóstico é realizado através da observação de proglotes ou ovos, nas fezes do hospedeiro (Lauckner, 1985; Dailey, 2001).

Em pinípedes que estão em processo de reabilitação, é realizada uma profilaxia com praziquantel (10 mg/kg) em dois dias consecutivos (Dailey, 2001).

### 3.3. Tremátodes

A Classe Trematoda (Subclasse Digenea), pertencente ao filo Platyhelminthes, é constituída por helmintes achatados dorso-ventralmente, com simetria bilateral e normalmente hermafroditas. O ciclo de vida destes parasitas é indireto, com duas fases: assexuada que ocorre tipicamente em moluscos e a sexuada que se encontra em hospedeiros vertebrados. Podem ainda ocorrer ciclos com dois hospedeiros intermediários (Bowman, 2014).

Os tremátodes que parasitam o sistema gastrointestinal dos pinípedes pertencem às famílias Heterophyidae (géneros *Cryptocotyle*, *Galactosomum*, *Ascocotyle* (*Phagicola*), *Phocitrema*, *Pricetrema*, *Stictodora*, *Heterophyopsis*, *Apophallus* (*Rossicotrema*) e *Mesostphanus*); Notocotylidae (género *Ogmogaster*); e Microphallidae (géneros *Microphallus* e *Maritrema*) (Dailey, 2001; Raga et al., 2009).

A família Heterophyidae está bastante difundida entre pinípedes, principalmente no Hemisfério Norte. Membros desta família já foram reportados em *Pusa hispida*, *Pusa caspica*, *Phoca vitulina*, *Phoca largha*, *Erignathus barbatus*, *Mirounga angustirostris*, *Callorhinus ursinus*, *Eumetopias jubatus* e *Zalophus californianus* (Lauckner, 1985). Foram reportadas cerca de doze espécies intestinais, pertencendo aos géneros acima listados. Em relação aos ciclos de vida destes parasitas, pouco ou nada se conhece. Tendo por base deduções realizadas a partir de outras espécies, é muito provável que um gastrópode seja o primeiro hospedeiro intermediário e que várias espécies de peixe representem o segundo hospedeiro intermediário. A maioria das formas larvares da família Microphallidae está enquistada em crustáceos bênticos, como tal, a ocorrência destes parasitas em pinípedes pode dever-se à sua alimentação. Tal acontece, igualmente, com espécies da família Notocotylidae. Já foram reportados casos de infeção por parasitas das famílias Microphallidae e Notocotylidae na espécie *Erignathus barbatus* e nas espécies *Leptonychotes weddellii* e *Lobodon carcinophagus*, respetivamente (Raga et al., 2009).

Os tremátodes intestinais podem ocorrer em números elevados, mas não são considerados patogénicos nestes animais. Em leões-marinhos-californianos e elefantes-marinhos, o tratamento com uma dose única de praziquantel (10 mg/kg) foi eficaz na remoção de ovos nas fezes (Dailey, 2001).

Os parasitas desta classe, que parasitam o fígado, sistema biliar e pâncreas de pinípedes, consistem em duas famílias e cinco géneros: Brachycladiidae (anteriormente denominada



Campulidae) – *Orthosplanchnus*, *Zalophotrema*; e Opistorchiidae – *Opistorchis*, *Metorchis*, *Pseudamphistomum* (Dailey, 2001; Raga *et al.*, 2009).

Dentro da família Brachycladiidae, quatro espécies do género *Orthosplanchnus* infectam pinípedes de ambos os hemisférios (*Pusa hispida*, *Phoca largha*, *Erignathus barbatus*, *Leptonychotes weddellii*, *Eumetopias jubatus*). Ainda desta família, a espécie mais frequentemente relatada é *Zalophotrema hepaticum*, que está associada com *Zalophus californianus* e também já foi reportada em *Eumetopias jubatus*. Da família Opistorchiidae, já foram reportadas algumas espécies em focas no Hemisfério Norte (*Erignathus barbatus*, *Phoca vitulina*, *Pusa hispida*, *Halichoerus grypus* e *Pagophilus groenlandicus*). Os seus ciclos de vida são desconhecidos, mas é possível que várias espécies de peixe atuem como segundos hospedeiros intermediários (Raga *et al.*, 2009).

Não se verificam alterações hepáticas em todos os casos de infeção por estas famílias de tremátodes, mas quando a intensidade do parasitismo é elevada, podem ser observadas algumas lesões (Lauckner, 1985; Dailey, 2001).

Mais uma vez, um tratamento com praziquantel (10 mg/kg) foi bem-sucedido em leões-marinhos-californianos. O diagnóstico para este grupo de parasitas é realizado através da deteção de ovos nas fezes (Dailey, 2001).

### 3.4. Acantocéfalos

Acanthocephala é um filo de parasitas do sistema gastrointestinal de diversos vertebrados. Este grupo de parasitas caracteriza-se por ter uma probóscide invaginável com espinhos, que serve para a fixação na parede intestinal do hospedeiro. Não possuem sistema digestivo, sendo que os nutrientes são absorvidos através do tegumento e os sexos são distintos (Bowman, 2014). Deste filo, o género *Corynosoma* parasita várias espécies de pinípedes, e o género *Bolbosoma*, que é um parasita de cetáceos, pode ser encontrado acidentalmente em pinípedes. Ambos pertencem à família Polymorphidae (Lauckner, 1985; Dailey, 2001).

Em geral, os acantocéfalos exibem pouca ou nenhuma especificidade de hospedeiro (Lauckner, 1985; McFarlane, Norman & Jones, 2009). Lauckner (1985) indica 16 espécies do género *Corynosoma* que parasitam os pinípedes. Doze que ocorrem em hospedeiros no Hemisfério Norte e quatro que ocorrem no Hemisfério Sul. No Hemisfério Norte, a espécie com uma maior distribuição é *C. strumosum*, que parasita 13 espécies de pinípedes, de seguida, surgem *C. semerme* com 9 espécies de hospedeiros e *C. validum* que parasita 7 espécies; *C. villosum* e *C. wegneri*, cada um com 5 espécies de hospedeiros; e *C. magdalenii* e *C. osmeri*, parasitam cada um, duas espécies de pinípedes. Por último, *C. falcatum*, *C. similis*, *C. obtusens*, *C. reductum* e *C. rauschi*, todos no Hemisfério Norte, cada um foi apenas reportado numa única espécie de hospedeiro. No Hemisfério Sul, foram reportados *C. australe* e *C. hamanni* em quatro espécies cada e *C. bullosum* em 3 espécies

de pinípedes. *C. sipho* foi encontrado em apenas uma espécie de pinípedes. Foram também reportadas as espécies *C. arctocephali*, *C. evae*, *C. pseudohamanni*, e ainda *C. cetaceum* (espécie parasitária de cetáceos) em pinípedes no Hemisfério Sul (McFarlane, Norman & Jones, 2009). Assim, este grupo de parasitas já foi reportado em praticamente todas as espécies de ambas as famílias Phocidae e Otariidae, com exceção de *Pusa sibirica* e *Monachus monachus* (Lauckner, 1985). As espécies mais comuns em pinípedes em centros de reabilitação são *C. strumosum*, *C. semerme*, *C. villosum* e *C. wegneri* (Dailey, 2001).

Em pinípedes, pouco se sabe sobre os efeitos destes parasitas. Os cistacantos infetantes são ingeridos por pequenos crustáceos, que depois de ingeridos por peixes, enquistam no mesentério destes. Os pinípedes quando se alimentam são infetados e, no intestino, os parasitas adultos desenvolvem-se e fixam-se à mucosa intestinal. Isto provoca uma reação inflamatória localizada, usualmente limitada à mucosa (Dailey, 2005; McFarlane *et al.*, 2009; Raga *et al.*, 2009).

O diagnóstico para este grupo de parasitas é realizado pela detecção de ovos nas fezes, mas o tratamento está mal documentado. Ainda há muito por descobrir e conhecer sobre a biologia destes parasitas e os seus efeitos na saúde destes hospedeiros (Dailey, 2001; McFarlane *et al.*, 2009).

### **3.5. Protozoários**

Os protozoários são organismos unicelulares, sendo que a maioria é de vida livre, no entanto, alguns são parasitas e podem provocar doença em animais. Compõem o Reino Protista, que inclui flagelados, amebas, apicomplexos e ciliados. Variam em tamanho, forma e estrutura, e em grande parte são microscópicos (Hendrix & Robinson, 2012).

Alguns dos agentes que os parasitam são *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., *Sarcocystis* spp. e *Toxoplasma* spp. (Lauckner, 1985; Dailey, 2001).

#### **3.5.1. *Giardia* spp.**

*Giardia* spp. é um protozoário flagelado que parasita o sistema gastrointestinal de muitos animais vertebrados. A nomenclatura deste género está em constante mudança, e na base da biologia molecular, os grupos da espécie *Giardia duodenalis* são atualmente organizados em 8 *assemblages* (de A a H). Os *assemblages* A e B infetam a maioria dos vertebrados, mas são normalmente os que se encontram em humanos, portanto são considerados zoonóticos; C e D compõem a maioria dos organismos que se podem encontrar em cães; o E é encontrado em ungulados; o *assemblage* F constitui as formas parasitárias do gato e o G do rato. O grupo mais recente é o *assemblage* H que foi encontrado em focas (Lasek-Nesselquist, Welch & Sogin, 2010; Bowman, 2014).

Os *assemblage* A e B são os mais identificados em pinípedes (Appelbee, Thompson & Olson, 2005; Appelbee, Thompson, Measures & Olson, 2010; Lasek-Nesselquist *et al.*,

2010). Assemblages C e D foram descritos em *Phoca vitulina* e o mais recente, assemblage H, foi identificado em *Halichoerus grypus* (Gaydos *et al.*, 2008; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010).

*Giardia duodenalis* já foi reportado na América do Norte, em focas das espécies: *Phoca hispida*, *Phoca groenlandica*, *Halichoerus grypus*, *Phoca vitulina*, *Erignathus barbatus* e *Cystophora cristata* (Olson, Roach, Stabler & Chan, 1997; Measures & Olson, 1999; Hughes-Hanks *et al.*, 2005; Dixon *et al.*, 2008; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010). E ainda em duas espécies de otariídeos, *Zalophus californianus*, na América do Norte e *Neophoca cinerea*, reportado na Austrália (Deng, Peterson & Cliver, 2000; Delpont *et al.*, 2014).

O ciclo de vida de *Giardia* é direto e apresenta dois estádios, o trofozoíto e o quisto. Em alguns hospedeiros, foi possível observar trofozoítos no duodeno, jejuno e íleo, assim como, quistos nas fezes. Isto confirma que os quistos deram origem a trofozoítos depois de ingeridos, e existiu replicação por parte dos trofozoítos. Assim, os conteúdos intestinais e fecais de vários pinípedes sugerem que existe uma infecção real e, não apenas uma transferência passiva de quistos de *G. duodenalis*, que não desenquistaram e não se replicaram nestes animais (pseudoparasitismo). No entanto, os efeitos da infecção requerem uma maior investigação (Dixon *et al.*, 2008; Appelbee *et al.*, 2010).

Para se obter um diagnóstico de *Giardia* nestas espécies, as amostras fecais são purificadas através de centrifugação, depois examinadas para a presença de quistos, utilizando anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína, e observadas ao microscópio (Imunofluorescência Direta) (Olson *et al.*, 1997; Measures & Olson, 1999; Appelbee *et al.*, 2010). Recorre-se usualmente a técnicas moleculares, realizando extração de ADN, amplificação através de PCR e análise sequencial (Appelbee *et al.*, 2010; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010; Delpont *et al.*, 2014). PCR é uma mais-valia como ferramenta de diagnóstico para a deteção de níveis baixos ou intermitentes de parasitismo, nas amostras fecais. Fornece informação sobre possíveis fontes de transmissão e contaminação, através da monitorização das variantes genotípicas do parasita, numa região geográfica. Um outro método de diagnóstico é o exame histológico da superfície mucosa do intestino, que pode demonstrar uma infecção real e, quando combinado com análise por PCR, fornece um diagnóstico altamente sensível para *Giardia* (Appelbee *et al.*, 2010).

*G. duodenalis* é normalmente reportado em pinípedes distribuídos em zonas mais próximas a construções humanas, águas residuais e locais de escoamento. A deteção do assemblage A e B em pinípedes, apoia a hipótese de que uma fonte antropogénica de infecção pode estar a contaminar o ambiente marinho, devido a escoamento de esgotos não tratados ou de águas residuais provenientes de explorações agrícolas. Apesar da descoberta de genótipos semelhantes entre o ambiente marinho e terrestre, esta não é prova conclusiva de que ocorre transmissão zoonótica entre hospedeiros terrestres e marinhos (Measures & Olson, 1999; Appelbee *et al.*, 2010; Delpont *et al.*, 2014).

Delpont *et al.* (2014) verificaram que a presença de *G. duodenalis* é significativamente maior em animais provenientes de meio zoológico do que em animais selvagens, o que pode ser não só o resultado de um maior e mais próximo contacto com os humanos, mas também devido a uma maior densidade animal, pois a sua transmissão está facilitada, sendo um parasita monoxeno.

### **3.5.2. *Cryptosporidium* spp.**

*Cryptosporidium* spp. é um protozoário pertencente à subclasse Coccidea, que parasita o sistema gastrointestinal e causa doença entérica em humanos e outros animais. Pouco se sabe sobre a infeção por *Cryptosporidium* spp. em mamíferos marinhos, isto é, as potenciais fontes de infeção, o impacto da infeção na saúde dos animais, ou o possível papel destes mamíferos na transmissão deste parasita a outros animais e humanos (Santín, Dixon & Fayer, 2005). Já foram identificadas em mamíferos marinhos, várias espécies de *Cryptosporidium* presentes em humanos e mamíferos terrestres, incluindo *C. parvum*, *C. muris* e *C. hominis* (Deng *et al.*, 2000; Appelbee *et al.*, 2005, 2010; Hughes-Hanks *et al.*, 2005; Santín *et al.*, 2005; Dixon *et al.*, 2008). Foram identificados também dois novos genótipos, que parecem ser específicos para mamíferos marinhos, *Cryptosporidium* genótipo 1 em *Pusa hispida*, e genótipo 2 em *Phoca vitulina* e *Halichoerus grypus* (Santín *et al.*, 2005; Bogomolni *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2008). Mais recentemente, novos genótipos foram descritos em *Mirounga leonina*, *Pagophilus groenlandicus* e *Leptonychotes weddellii* (Rengifo-Herrera *et al.*, 2011, 2013; Bass *et al.*, 2012).

Em pinípedes, infeções por *Cryptosporidium* são reportadas em menor número que as provocadas por *Giardia duodenalis* (Appelbee *et al.*, 2005, 2010; Delpont *et al.*, 2014).

O diagnóstico para *Cryptosporidium* em pinípedes, é realizado da mesma forma que para *Giardia*, utilizando a Imunofluorescência Direta para detetar oocistos e também técnicas moleculares (PCR) (Olson *et al.*, 1997; Santín *et al.*, 2005; Appelbee *et al.*, 2010; Rengifo-Herrera *et al.*, 2013; Delpont *et al.*, 2014).

Tal como para *Giardia*, a técnica PCR é uma mais-valia como ferramenta de diagnóstico, para a deteção de níveis baixos ou intermitentes de parasitismo, e o exame histológico da superfície mucosa do intestino pode demonstrar uma infeção real que, quando combinado com análise por PCR, fornece um diagnóstico altamente sensível para *Cryptosporidium* (Appelbe *et al.*, 2010).

É importante continuar a identificar e caracterizar geneticamente as espécies e subtipos de *Cryptosporidium* e *Giardia* encontrados no ambiente marinho, a fim de perceber qual a importância das atividades antropogénicas como potenciais fontes de infeção em pinípedes (Appelbee *et al.*, 2005, 2010).

### 3.5.3. Outras coccídeas

Os protozoários mais comuns em pinípedes pertencem à subclasse Coccidea e aos géneros *Eimeria*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma* (Lauckner, 1985).

Do género *Eimeira*, a espécie que melhor se conhece é *E. phocae*, observada em foca-comum (*Phoca vitulina*) (McClelland, 1993; Van Bolhuis, Philippa, Gajadhar, Osterhaus & Kuiken, 2007). Em fezes de focas do Antártico, observaram-se oocistos de outras espécies de *Eimeria*. Baseado na descrição morfológica dos oocistos esporulados, foram identificados *E. weddellii* e *E. arctowski*, em focas da espécie *Leptonychotes weddelli* (Carlson-Bremer *et al.*, 2012a).

Os sinais clínicos observados, para *E. phocae*, dependem da intensidade da infeção. A infeção pode ser assintomática ou apenas existir o vómito, quando é uma infeção leve. Numa infeção intensa, surge vómito, letargia, perda de apetite e diarreia hemorrágica (McClelland, 1993). Em certos casos, também se observaram convulsões intermitentes e tremores musculares pouco tempo antes da morte, sendo que estes sinais nervosos se assemelham aos de coccidiose em vitelos, provocados por *E. zuernii* e *E. bovis* na América do Norte e Austrália. As principais lesões encontradas foram enterocolite necrótica e hemorrágica difusa e grave, lesões inflamatórias difusas na lâmina própria da mucosa do jejuno, íleo, colon e cego, que estavam associadas à presença de estádios reprodutivos e oocistos não esporulados de *E. phocae*. No caso dos hospedeiros com sintomas nervosos, não foram observadas lesões no cérebro e cerebelo (Van Bolhuis *et al.*, 2007).

Normalmente, as infeções por *E. phocae* ocorrem em locais com uma densidade de animais elevada. Esta situação ocorre principalmente no verão, quando muitas crias de focas, que são abandonadas ou feridas, são admitidas em centros de reabilitação (McClelland, 1993; Van Bolhuis *et al.*, 2007).

As infeções foram diagnosticadas pela presença de oocistos em esfregaços fecais frescos ou flutuação (McClelland, 1993). A identificação da espécie baseia-se na identificação dos oocistos esporulados, mas quando não presentes, a identificação é realizada com oocistos não esporulados (Van Bolhuis *et al.*, 2007).

Os oocistos de *E. phocae* esporulam em fezes incubadas sob ar húmido, mas não quando são suspensas em água do mar. Assim, os oocistos provavelmente esporulam em terra. Dado que a transmissão de *E. phocae* parece ser direta, pode entender-se que focas em ambiente selvagem e em ambiente zoológico/reabilitação, em áreas com uma densidade de animais elevada, possam infetar-se pela ingestão ou inalação de oocistos esporulados veiculados pela pelagem suja (McClelland, 1993).

Em relação ao género *Toxoplasma*, foram detetados anticorpos para a espécie *Toxoplasma gondii* em *Zalophus californianus*, *Phoca vitulina*, *Pusa hispida*, *Erignathus barbatus* e *Phoca largha*. As principais fontes de infeção são a ingestão de oocistos em água ou alimento contaminado e a ingestão de tecidos infetados por *T. gondii*. É possível que haja

contaminação da água do mar, através de esgotos que contenham fezes de gato parasitadas. O papel dos invertebrados marinhos, que fazem parte da alimentação de algumas espécies de pinípedes, ainda não é conhecido. *T. gondii* não parasita nenhum animal de sangue frio, no entanto, moluscos bivalves podem filtrar grandes quantidades de água e concentrar microrganismos que estão presentes na água. A nível experimental, oocistos de *T. gondii* foram concentrados por moluscos bivalves (Dubey *et al.*, 2003). *T. gondii* foi ainda documentado nas espécies *Mirounga angustirostris* e *Callorhinus ursinus* (Colegrove *et al.*, 2011).

Foram também encontrados anticorpos para *Neospora caninum* nas espécies *Zalophus californianus*, *Pusa hispida*, *Phoca vitulina* e *Erignathus barbatus* (Dubey *et al.*, 2003).

Estão documentadas também três novas espécies de coccídeas em *Zalophus californianus*, com presença de formas sexuadas e assexuadas, no epitélio do trato intestinal destes animais. Através de PCR determinou-se que estão próximas a *N. caninum* (Colegrove *et al.*, 2011).

*Sarcocystis neurona*, agente responsável pela mieloencefalite protozoária equina, está documentado em mamíferos marinhos, e *Sarcocystis* spp. associado a hepatite necrótica fatal já foi reportado em *Zalophus californianus* e *Monachus schauinslandi* (Miller, 2008).

Em *Zalophus californianus*, foi ainda detetado miosite associada a *S. neurona* (Carlson-Bremer, Gulland, Johnson, Colegrove & Van Bonn, 2012b).

Para além dos parasitas referidos, em *Mirounga leonina* reportou-se *Isospora miroungae*, e ainda em fezes de *Leptonychotes weddellii* e *Lobodon carcinophagus*, foram reportados três outras espécies de coccídeas, às quais não foi atribuída uma denominação por falta de informação (Carlson-Bremer *et al.*, 2012a).

### 3.6. Hemoplasmas

Os hemoplasmas (nome comum para espécies hemotróficas de *Mycoplasma*) são bactérias intracelulares facultativas sem parede celular, que parasitam os eritrócitos de animais vertebrados, sendo que uns se fixam à célula, outros penetram na célula. Originalmente eram conhecidos como *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, mas foram reclassificados dentro do género *Mycoplasma* (Willi *et al.*, 2007; Volokhov *et al.*, 2001; Bowman, 2014).

Volokhov *et al.* (2011) é o primeiro e único relato de hemoplasmas em mamíferos marinhos. Foram detetados hemoplasmas através de PCR, em amostras sanguíneas de leões-marinhos-californianos (*Zalophus californianus*). As amostras positivas para PCR foram também testadas por RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), para demonstrar se os hemoplasmas eram organismos viáveis. O RT-PCR demonstrou a presença de rARN do parasita, o que sugere a presença de hemoplasmas potencialmente viáveis, na corrente sanguínea dos hospedeiros. A análise filogenética revelou, que este organismo tem um nível baixo de semelhança genética com outros hemoplasmas descritos

e, devido ao hospedeiro no qual foi detetado, é considerado uma nova espécie de *Mycoplasma*, com o nome provisório *Candidatus Mycoplasma haemozalophi* (Volokhov *et al.*, 2011).

O diagnóstico *gold standard* para a deteção da infeção em animais e humanos, é uma combinação entre o esfregaço sanguíneo corado pela técnica de *Romanowsky-Giemsa* e a técnica de PCR (Willi *et al.*, 2007).

A infeção por espécies hemotróficas de *Mycoplasma* estão normalmente associadas a anemia, no entanto, pode existir uma infeção sem que exista anemia e alteração dos parâmetros hematológicos (Willi *et al.*, 2007). A presença de *Candidatus Mycoplasma haemozalophi* não foi acompanhada de anemia, o que pode refletir uma baixa patogenicidade deste *Mycoplasma* no hospedeiro, ou uma adaptação entre o hospedeiro e o hemoplasma (Volokhov *et al.*, 2011).

A transmissão de *Mycoplasma* spp. hemotróficos, em vários animais, é realizada através de artrópodes hematófagos (Willi *et al.*, 2007; Bowman, 2014). Isto também pode ser uma hipótese para a origem da infeção em leões-marinhos. Em todos os animais nos quais se obteve resultado positivo, verificou-se que também estavam parasitados com uma espécie de *Acanthocheilonema* (com uma grande proximidade a *A. viteae*). Assim, tendo como hipótese que *E. horridus* é vetor de *A. spirocauda*, poderia também ser vetor de *Mycoplasma*, mas esta é apenas uma ideia especulativa que necessita de maior investigação. Outras hipóteses de vias de transmissão poderão ser a transplacentária e a transmamária, que são sugeridas para *M. haemolamae* em alpacas, que é o mais próximo filogeneticamente de *Candidatus Mycoplasma haemozalophi* (Volokhov *et al.*, 2011).

Nos gatos, especula-se se as interações agressivas (lutas) entre animais poderão ser a principal via de transmissão para *Mycoplasma* hemotrófico (Willi *et al.*, 2007). Esta hipótese talvez seja também plausível para a transmissão deste parasita entre pinípedes no ambiente selvagem.

#### IV. ESTUDO SOBRE PARASITOSES CARDIOPULMONARES E GASTROINTESTINAIS EM PINÍPEDES NUM CONTEXTO ZOOLOGICO

##### 1. Objetivos do Estudo

A infecção por vermes cardiopulmonares tem alguns casos documentados em pinípedes em todo o mundo. No entanto, em Portugal, escassas pesquisas foram efetuadas nas espécies em estudo. Considerando estas premissas, os principais objetivos desta dissertação foram:

- 1) Realizar um rastreio de parasitas cardiopulmonares e gastrointestinais na coleção zoológica de pinípedes, presente no Zoomarine.
- 2) Identificar os parasitas e as lesões associadas, encontrados em necrópsias realizadas anteriormente e no decorrer da presente dissertação.
- 3) Obter um maior conhecimento sobre a fauna parasitária que pode afetar mamíferos marinhos, particularmente pinípedes.

##### 2. Material e Métodos

###### 2.1. Caracterização da população amostrada e local de recolha

A população em estudo é constituída por 20 indivíduos, de três espécies e uma subespécie diferentes:

- 6 (30%) focas-comuns (*Phoca vitulina*);
- 2 (10%) focas cinzentas (*Halichoerus grypus*);
- 6 (30%) leões-marinheiros-californianos (*Zalophus californianus*);
- 6 (30%) otárias-sul-africanas (*Arctocephalus pusillus pusillus*).

No total foram recolhidas 19 amostras de sangue (n=19) e 79 amostras de fezes (n=79). A distribuição do número de amostras por espécie encontra-se ilustrada na Tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição do número de amostras por espécie.

Espécie	Nº de amostras de sangue		Nº de amostras de fezes	
<i>Phoca vitulina</i>	6	29,11%	23	31,58%
<i>Halichoerus grypus</i>	2	10,13%	8	10,53%
<i>Zalophus californianus</i>	5	30,38%	24	26,32%
<i>Arctocephalus p. pusillus</i>	6	30,38%	24	31,58%
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>100%</b>	<b>79</b>	<b>100%</b>



A média de idades da população é 16,35 anos, tendo os animais mais novos 3 anos e os mais velhos 26 anos. Relativamente ao género, 14 (70%) indivíduos pertencem ao sexo masculino e seis (30%) ao sexo feminino.

Apenas um indivíduo, da subespécie *Arctocephalus p. pusillus*, apresentava sinais clínicos de doença cardiopulmonar: tosse e cansaço.

Para além das amostras acima mencionadas, incluíram-se ainda neste estudo, vermes adultos encontrados no coração e artéria pulmonar e amostras para análise histopatológica, provenientes de duas necrópsias de dois indivíduos da subespécie *Arctocephalus p. pusillus*, realizadas a 14 de Novembro de 2013 (Caso 1) e a 21 de Outubro de 2014 (Caso 2). Ambos os animais já tinham idades avançadas, 25 e 26 anos de idade, respetivamente.

A totalidade das amostras deste trabalho, foi recolhida no parque oceanográfico Zoomarine, localizado na Guia, concelho de Albufeira. Situada a sul de Portugal, esta zona é caracterizada por um clima temperado mediterrânico, com Inverno chuvoso, mas curto e ameno (com precipitação concentrada entre Outubro e Abril) e Verão quente, seco e longo (Oliveira, 2013). Os animais em estudo encontram-se em duas áreas distintas e próximas, dentro do parque, constituídas por piscinas e respetiva área seca, ambas ao ar livre.

## **2.2. Colheita e processamento de amostras**

As colheitas de amostras (fecais e sanguíneas) iniciaram-se a 25 de Abril de 2015 e terminaram a 26 de Maio de 2015. Procedeu-se a uma nova colheita de fezes a 27 de Julho de 2015, que terminou a 22 de Agosto de 2015.

Foi colhida uma amostra de sangue por cada animal, a partir da veia interdigital na barbatana posterior ou veia glútea caudal, no caso dos otariídeos, e da veia intervertebral (epidural), no caso dos focídeos, baseado na técnica apresentada por Gulland, Haulena & Dierauf (2001). O sangue, após a colheita, foi conservado em tubo com anticoagulante *Ethylene Diamine Tetra acetic Acid* (EDTA) e refrigerado a 4°C. As análises foram realizadas dentro do intervalo máximo de uma semana.

Realizaram-se colheitas individuais de fezes, três por animal, em dias distintos. Desta forma, os animais foram colocados em ambiente seco durante a noite, para que fosse possível a recolha individual das fezes. Posteriormente, foram recolhidas para um frasco de plástico e refrigeradas a 4°C. Todas as amostras fecais foram analisadas dentro de um intervalo máximo de 30 dias.

O transporte das amostras do Algarve até ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-UL, foi realizado em mala térmica, a fim de manter a refrigeração.

Em relação às amostras destinadas a histopatologia, estas foram guardadas em frascos com formol a 10%, até ao momento da sua análise no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UL.

## 2.3. Métodos utilizados no processamento e análise das amostras

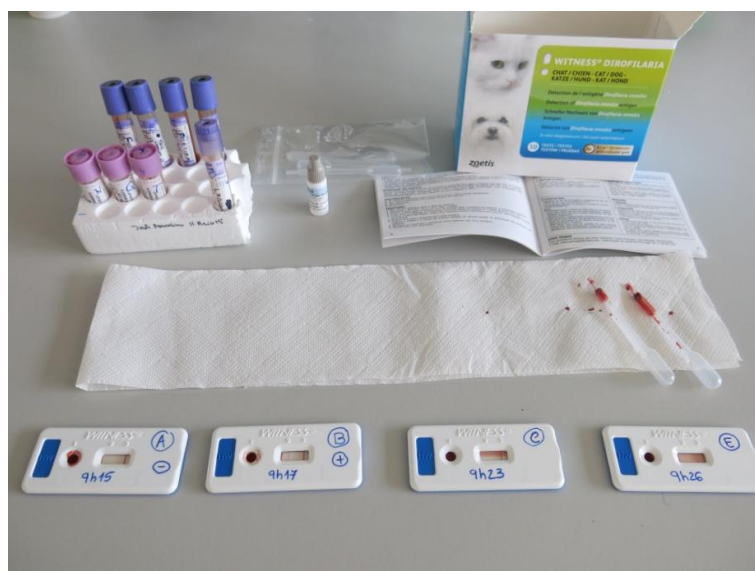
### 2.3.1. Processamento de Amostras Sanguíneas

Para a realização das análises das amostras sanguíneas foram utilizadas as seguintes técnicas: teste rápido para pesquisa de infecção por *Dirofilaria immitis* (imunomigração rápida), técnica de Knott modificada, técnica de coloração das fosfatases ácidas e esfregaço sanguíneo. As três primeiras técnicas foram realizadas com o objetivo de avaliar a existência de infecção parasitária por filarídeos e identificar as microfilárias, quando presentes. Por sua vez, os esfregaços sanguíneos foram corados e observados para a pesquisa de hemoplasmas.

#### 2.3.1.1. Imunomigração rápida

Para detetar a presença de antígeno de *D. immitis* nas amostras em estudo, utilizou-se o teste rápido da marca WITNESS® *Dirofilaria* (Figura 11) para cada uma das amostras sanguíneas (Alho *et al.*, 2014d). De acordo com o protocolo do fabricante, colocou-se uma gota de sangue na primeira membrana, seguida de 3 gotas de solução reagente (parte do kit) e decorridos 10 minutos, registou-se o resultado. Um resultado foi considerado positivo quando apresentava duas bandas de coloração rosa (a primeira de resultado e a segunda de controlo), sendo que os negativos apenas apresentavam uma banda de coloração rosa, correspondente ao controlo.

Figura 11 – Realização de testes rápidos WITNESS® *Dirofilaria* (original).

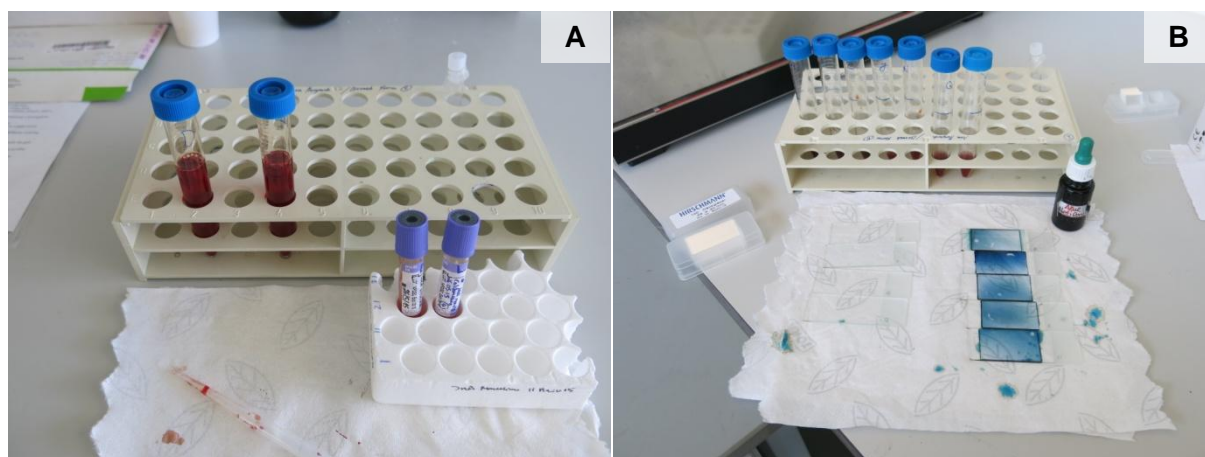


#### 2.3.1.2. Técnica de Knott modificada

Após a realização do teste rápido, procedeu-se à realização da Técnica de Knott modificada (Figura 12), adaptado de Zajac & Conboy (2012), a qual é utilizada para concentração e

identificação de microfilárias no sangue. O procedimento consiste em colocar 9 ml de formol a 2% num tubo de centrifugação de 15 ml e adicionar 1 ml de sangue em EDTA, agitando ligeiramente para homogeneizar e, de seguida, procede-se à centrifugação durante 5 minutos a 500G. Elimina-se o sobrenadante, adiciona-se uma gota do corante Azul-de-metileno, colocam-se umas gotas do sedimento obtido entre lâmina e lamela e observa-se ao microscópio ótico. Através deste método, pode medir-se as dimensões das microfilárias e observar a sua conformação e, desse modo, proceder à sua identificação. A observação foi realizada com ampliações de 100x e 400x.

Figura 12 – Realização de técnica de Knott modificada. Preparação (A) e Observação (B) (original).



#### 2.3.1.3. Fosfatases ácidas

Para a diferenciação de microfilárias utilizou-se a técnica de coloração das Fosfatases Ácidas, com o *kit* Leucognost® AP (Alho *et al.*, 2014d). Este teste vai evidenciar a atividade das fosfatases ácidas nas microfilárias que, consoante a espécie, assume um padrão de distribuição característico. Esta técnica foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, utilizando-se esfregaços sanguíneos secos e não corados, das amostras positivas para o teste rápido ou para a técnica de Knott. Após a realização da técnica, os esfregaços foram observados ao microscópio em ampliação de 100x e 400x.

#### 2.3.1.4. Esfregaços sanguíneos

Para pesquisa de hemoplasmas foram elaborados dois esfregaços sanguíneos por escorregamento, para cada amostra sanguínea. Depois de secos, procedeu-se à coloração das lâminas pelo corante Giemsa. Primeiro, coloca-se metanol durante um minuto para a fixação e posteriormente, o corante puro durante 30 segundos, seguido de lavagem sob água corrente, e secagem ao ar. Depois de corados, os esfregaços foram observados ao microscópio com uma ampliação de 1000x, usando óleo de imersão (Vidal, 2013).

### 2.3.2. Processamento de Amostras Fecais

Para a realização da análise das amostras de fezes foram utilizados quatro métodos coprológicos, sendo que três dos quatro métodos foram efetuados em série (Lopes, 2013). Foram estes, a técnica de McMaster, técnica de Flutuação de Willis e técnica de Sedimentação em meio saturado (Figura 13). O processo consistiu em homogeneizar as fezes com uma vareta de vidro, seguido da pesagem de 2 gramas das mesmas, que posteriormente eram colocadas num copo com 28 mililitros de solução saturada de sacarose e novamente homogeneizadas. De seguida, procedia-se à filtração através de um passador e colocação da preparação numa câmara de McMaster e também num tubo de ensaio. O tubo de ensaio servia para ambas as técnicas de flutuação e sedimentação, pois o conteúdo que flutuava, adería à lamela colocada em cima do tubo de ensaio e o sedimento que restava após descartar o sobrenadante, era pipetado e corado. O quarto e último método coprológico usado foi a Técnica de Baermann, para pesquisa de formas larvares de vermes pulmonares (Alho *et al.*, 2013).

Figura 13 – Técnicas de Baermann, sedimentação e flutuação (original).



#### 2.3.2.1. Técnica de McMaster

Esta técnica coprológica é quantitativa, porque está indicada para a contagem de formas parasitárias, permitindo estimar o número de ovos/larvas/oocistos por grama de fezes de um animal parasitado (Bowman, 2014). Como anteriormente referido, pesam-se as fezes (2 g) e homogeneizam-se com a solução saturada de sacarose (28 ml) e de seguida, filtra-se e transfere-se a preparação para a câmara de McMaster. Passados alguns minutos os ovos terão aderido à parte inferior da lâmina superior da câmara e, no microscópio, focando as grelhas da câmara numa ampliação de 100x, podem ser observados ovos e realizar-se a

sua contagem, valor que é multiplicado pelo fator de multiplicação x50 (limiar de detecção é igual a 50 ovos por grama), obtendo-se o total de OPG (ovos por grama) (Lopes, 2013).

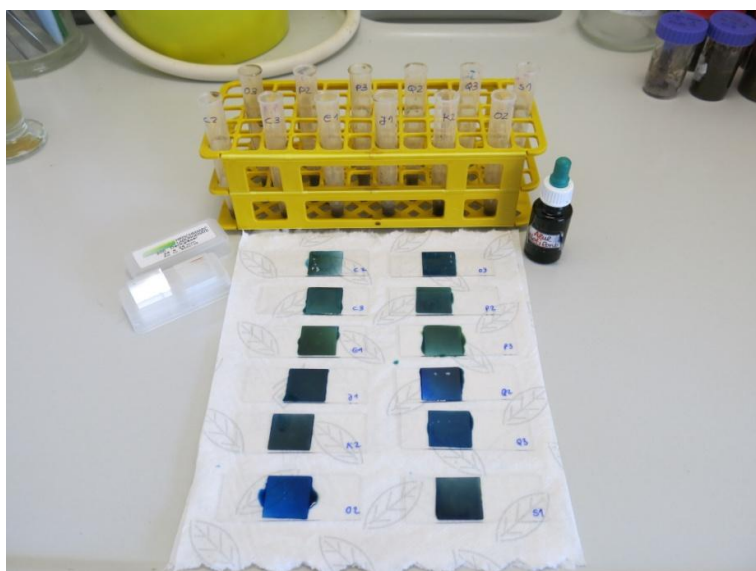
#### **2.3.2.2. Flutuação pelo método de Willis**

Este método de análise coprológica é usado para pesquisa de ovos de nemátodes e céstodes e alguns protozoários (Bowman, 2014). Caracteriza-se por ser uma técnica qualitativa, a qual se baseia na diferença de densidade entre a solução saturada de sacarose e os ovos destes parasitas. Depois de homogeneizada e filtrada a mistura de fezes, com a solução saturada de sacarose, é transferida para um tubo de ensaio, formando um menisco convexo no topo e por cima coloca-se uma lamela. Sendo a densidade dos ovos mais baixa que a da solução, estes vão flutuar e aderir à lamela, a qual é posteriormente colocada numa lâmina e observada ao microscópio numa ampliação de 40x, 100x e 400x (Lopes, 2013).

#### **2.3.2.3. Sedimentação em meio saturado**

Tal como a Flutuação de Willis, a Sedimentação em meio saturado (Figura 14) é uma técnica qualitativa. Permite pesquisar ovos de tremátodes e de acantocéfalos, os quais são mais pesados (Bowman, 2014). Neste método a solução de sacarose tem uma densidade menor do que a densidade dos ovos, como tal, estes ficam depositados no fundo do tubo de ensaio, juntamente com sedimentos fecais. Depois de passados 15 minutos, elimina-se o líquido sobrenadante, ficando apenas o sedimento, que é retirado com uma pipeta de Pasteur e colocado numa lâmina juntamente com o corante Azul-de-metileno. Coloca-se a lamela em cima da lâmina e é observada ao microscópio numa ampliação de 40x, 100x e 400x (Lopes, 2013).

Figura 14 – Técnica de sedimentação em meio saturado (original).



#### **2.3.2.4. Técnica de Baermann**

O funcionamento desta técnica, adaptada de Alho *et al.* (2013), baseia-se na grande mobilidade das larvas, devido aos seus higrotropismo e termotropismo positivos. As fezes são colocadas num copo cónico, com água tépida, sendo que, devido ao calor e humidade há estimulação da mobilidade larvar, deslocando-se as larvas para a superfície da massa fecal. Não sendo possível nadar contra a gravidade, as larvas vão sedimentar no fundo do copo. O processo passa por colocar uma quantidade de fezes numa compressa de gaze, embrulhando para formar uma bolsa. Após a adição de água morna no copo, coloca-se a bolsa com as fezes dentro do mesmo, prendendo-a no topo. Deve verificar-se sempre se a amostra está mergulhada na água na sua totalidade. Passadas 24 horas retira-se o sedimento com uma pipeta de Pasteur, coloca-se num tubo de eppendorf para centrifugar (2 minutos a 448G), de seguida elimina-se o sobrenadante e coloca-se umas gotas de sedimento entre lâmina e lamela para observar ao microscópio. As observações foram realizadas com ampliações de 40x e 100x.

#### **2.3.2.5. Esfregaços fecais**

Para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., foi realizado um esfregaço fecal por cada animal, para o qual se retirou uma pequena quantidade de fezes, depois de homogeneizadas, com uma vareta de vidro, sendo distribuídas numa lâmina formando uma camada fina. Depois de secos ao ar, os esfregaços são fixados com metanol durante um minuto. Posteriormente, são corados através da técnica de Ziehl-Neelsen modificada. As lâminas são cobertas com fucsina durante 10 minutos, sendo de seguida lavadas sob água corrente. Realiza-se uma lavagem com álcool clorídrico a 1% e, novamente, com água corrente. De seguida, as lâminas são cobertas com verde malaquite a 0,4% durante 30 segundos e, pela última vez, lavadas com água corrente. A secagem das lâminas é realizada ao ar. Após a secagem, procedeu-se à observação ao microscópio com uma ampliação de 1000x, utilizando óleo de imersão (Casemore, Armstrong, & Sands, 1985).

#### **2.3.3. Identificação de vermes adultos**

Os vermes adultos (Figura 15) encontrados nas duas necrópsias anteriormente referidas foram submetidos a identificação morfológica baseada em Furtado, Melo, Giese, & Santos (2010). Para tal, os vermes foram mergulhados em lactofenol (agente esclarecedor) durante 5 dias. Foi realizada a contagem e medição dos vermes e de seguida, realizou-se uma montagem em lâmina e lamela, para a observação ao microscópio. Para proceder à identificação do parasita, observaram-se as estruturas internas e cutícula bem como a extremidade anterior e posterior de cada espécimen, numa ampliação de 40x e 100x.



Figura 15 – Vermes adultos retirados da artéria pulmonar durante uma necrópsia de *A. p. pusillus* (escala em cm) (original).



No sentido de obter uma confirmação morfológica e molecular, alguns dos vermes observados foram enviados para o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Bari, Itália. Foi realizada a identificação morfológica dos parasitas. Posteriormente, foi efetuada a extração do ADN dos mesmos utilizando um kit comercial (DNeasy Blood & Tissue, Qiagen, GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Procedeu-se à quantificação do ADN da amostra por espectrofotometria, no entanto, após diversas tentativas, a quantidade de ADN total foi inferior aos limites de deteção. Ainda assim, procedeu-se à amplificação pela técnica de PCR, gene COX-1 (689 pb), com os primers NTF (5'TGATTGGTGGTTTTGGTAA-3') e NTR (5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3') de acordo com Casiraghi *et al.* (2001).

#### **2.3.4. Técnica de Necrópsia**

As duas necrópsias incluídas no presente trabalho foram realizadas no Zoomarine com base na técnica apresentada por Nunes Petisca & Tavares Montano (1962), tal como se realiza na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Esta é uma técnica não específica para mamíferos marinhos, sendo assim adaptada para estes. Para particularidades de espécie pode ser consultada a técnica apresentada por Geraci & Lounsbury (2005).

Devido à descoberta de vermes no coração e veia pulmonar nas necrópsias, utilizou-se o teste rápido Uranovet® para deteção de antígeno de *D. immitis*. Sendo estes casos *post-mortem*, a amostra disponível e utilizada foi soro que se encontra armazenado no banco de soro do Zoomarine. O teste foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante.

### 2.3.5. Processamento de amostras para histopatologia

Como anteriormente referido, devido à presença de vermes no coração e veia pulmonar nas necrópsias, realizou-se um exame histopatológico às amostras colhidas durante as necrópsias. Estas amostras, mantidas em formol a 10%, foram cortadas (Figura 16) e colocadas em cassetes para processamento pela equipa técnica do Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UL. Os fragmentos obtidos do corte foram incluídos em parafina e cortados com o micrótomo. Por último, foi realizada a coloração com Hematoxilina-Eosina e montagem de lamelas, para posterior observação ao microscópio com ampliação de 40x, 100x e 400x.

Figura 16 – Corte das amostras para exame histopatológico e colocação nas cassetes (original).



### 2.4. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado o *software* Quantitative Parasitology 3.0 (Rózsa, Reiczigel & Majoros, 2000), disponível em <http://www.zoologia.hu/qp/qp.html>.

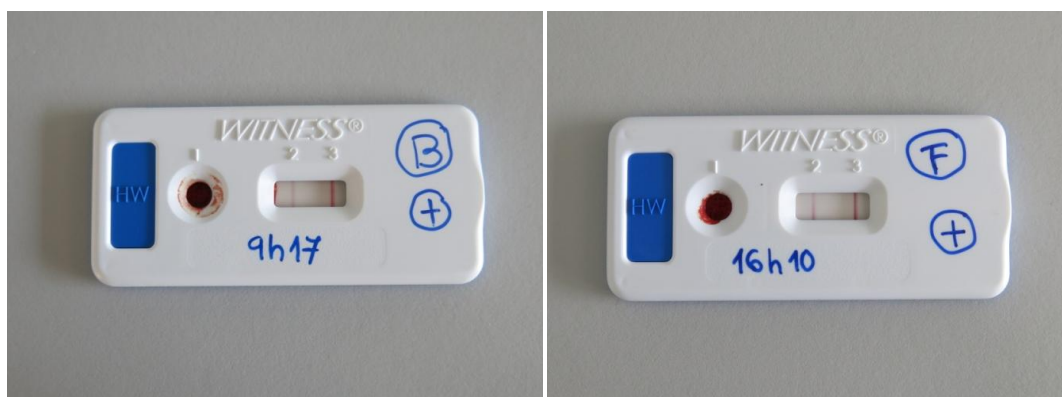
## 3. Resultados

### 3.1. Análises sanguíneas

Dos 19 testes rápidos realizados para pesquisa de infeção por vermes adultos de *D. immitis*, dois animais foram positivos (10,5%) de acordo com o protocolo do fabricante do teste, sendo ambos pertencentes à espécie *Phoca vitulina* (Figura 17).



Figura 17 – Os dois testes rápidos WITNESS® *Dirofilaria* nos quais se obteve resultado positivo (original).



Em relação à Técnica de Knott, apenas uma das 19 amostras de sangue (5,3%) testadas apresentava microfilárias, sendo esta amostra pertencente a um indivíduo da subespécie *Arctocephalus p. pusillus*. As microfilárias observadas mediam entre 300 e 305  $\mu\text{m}$  de comprimento e 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro, apresentando uma extremidade cefálica afunilada e a cauda pontiaguda (Figura 18).

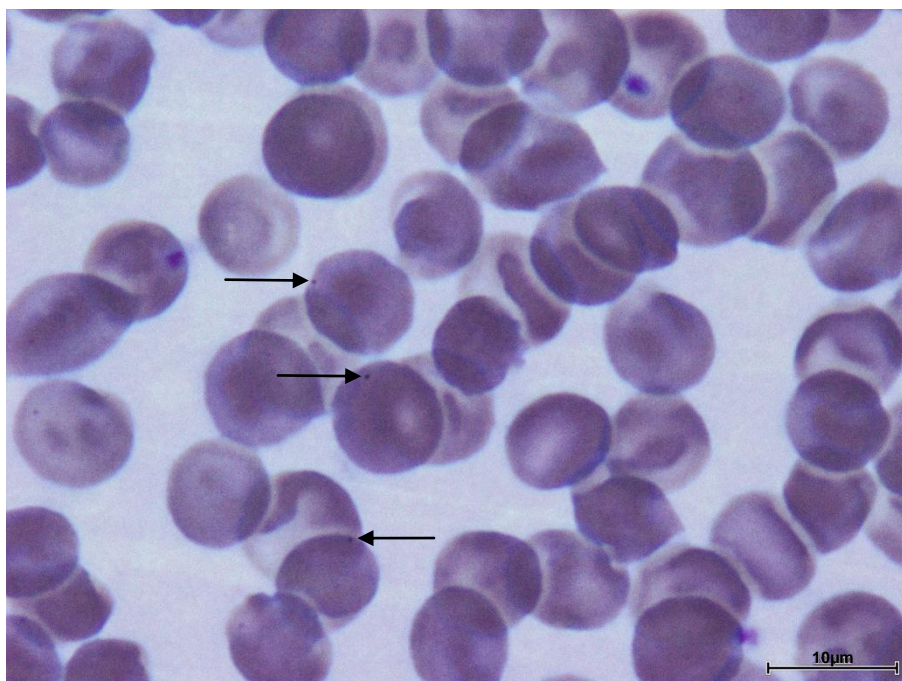
A técnica das fosfatases ácidas foi utilizada nas amostras positivas para o teste rápido ou para a técnica de Knott, como tal, três esfregaços sanguíneos foram utilizados. Todos foram considerados negativos, pois não existiam microfilárias presentes.

Figura 18 – Microfilária observada através de técnica de Knott (original).



Nos esfregaços corados por Giemsa, foram observadas nos eritrócitos estruturas semelhantes a *Mycoplasma* sp. (Figura 19). No total, 13 dos 19 esfregaços foram considerados positivos (68,4%) e seis considerados negativos. No entanto, dos 13 positivos, há dúvida presente em seis, e em seis negativos, há dúvida em três.

Figura 19 – Presença de estruturas semelhantes a *Mycoplasma*, indicadas pelas setas, em esfregaço sanguíneo corado por Giemsa (original).



### 3.2. Análises fecais

Na totalidade das amostras observadas (n=79) através de técnica de McMaster, Flutuação de Willis, Sedimentação em meio saturado e técnica de Baermann, não se observaram formas parasitárias, como tal, foram consideradas negativas. De igual modo, os 20 esfregaços fecais com a coloração de Ziehl-Neelsen foram considerados negativos, pois não se observaram oocistos de *Cryptosporidium* spp., nem trofozoítos ou quistos de *Giardia* spp.

### 3.3. Identificação de parasitas

Os nemátodes encontrados nas necrópsias de dois indivíduos da subespécie *Arctocephalus p. pusillus* apresentavam uma coloração esbranquiçada e uma forma alongada e filiforme. A extremidade cefálica era arredondada, com uma abertura bucal terminal e circular, cercada por quatro pares de papilas cefálicas e o corpo apresentava-se revestido por finas estrias transversais. Com base nas características morfológicas apresentadas e tendo por base a classificação de Furtado *et al.* (2010), os vermes foram identificados como pertencentes à espécie *Dirofilaria immitis*.

No Caso 1 (14/11/13), foram encontrados cerca de 15 parasitas no ventrículo direito e artéria pulmonar, pertencentes a ambos os sexos. O comprimento das fêmeas (Figura 20) variava entre 23,5–28,5 cm, com uma largura entre 0,7–1,0 mm. Os machos atingiam 15 cm de comprimento, com uma largura semelhante à observada nas fêmeas. Outros espécimes não estavam completos, ou seja, eram fragmentos apenas com extremidade posterior ou extremidade anterior.

No Caso 2 (21/10/14), foram encontrados cerca de 10 parasitas ao nível da artéria pulmonar, de ambos os sexos. As fêmeas atingiam os 23,6 cm de comprimento e 1 mm de largura. Devido à presença de fragmentos de vermes, não foi possível obter o comprimento total de um exemplar do sexo masculino.

Figura 20 – Pormenor da extremidade anterior (A) e extremidade posterior (B) de uma fêmea encontrada na artéria pulmonar (original).



No Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Bari, com base nas características morfológicas, foi constatada a confirmação da espécie *D. immitis*. Nas técnicas moleculares realizadas no mesmo local não se obteve sucesso.

### 3.4. Análise anatomopatológica

Como anteriormente referido, as amostras para histopatologia são provenientes de duas necrópsias da subespécie *Arctocephalus p. pusillus*, nas quais foram encontrados parasitas. Uma das necrópsias foi realizada em 2013 (Caso 1) e outra em 2014 (Caso 2).

A nível macroscópico no Caso 1 (14/11/13), a presença de parasitas verificou-se no ventrículo direito e grandes vasos (artéria pulmonar) (Figura 21). De notar também, lesões nos pulmões, como o aspeto marmoreado generalizado, com presença de pequenas lesões (até 5 mm) salientes e pálidas, disseminadas de forma não uniforme. Estas lesões ao tato eram crepitantes, compatíveis com áreas de enfisema pulmonar. Conforme indicado no Anexo 1, foi realizado um teste rápido Uranovet® para *D. immitis* com soro armazenado (nestes casos *post-mortem*), cujo resultado obtido foi negativo.

No Caso 2 (21/10/14), foi de notar as lesões dos pulmões (Figura 22): hepatização generalizada dos lobos pulmonares e também presença de padrão miliar com distribuição irregular heterogénea. Verificou-se a presença de parasitas na artéria pulmonar e também, congestão hepática. Foi realizado um teste rápido Uranovet® para *D. immitis*, utilizando-se soro e o resultado foi positivo.



Figura 21 – Presença de parasitas no ventrículo direito aberto de *A. p. pusillus* (Caso 1) (fonte: Zoomarine).

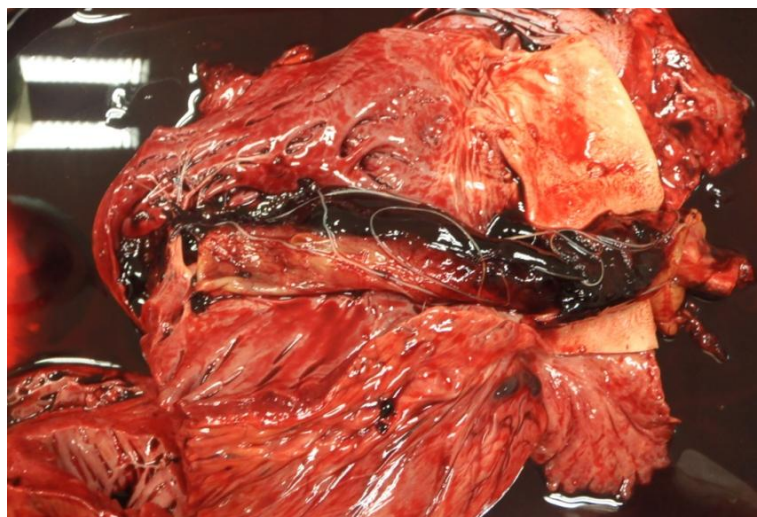


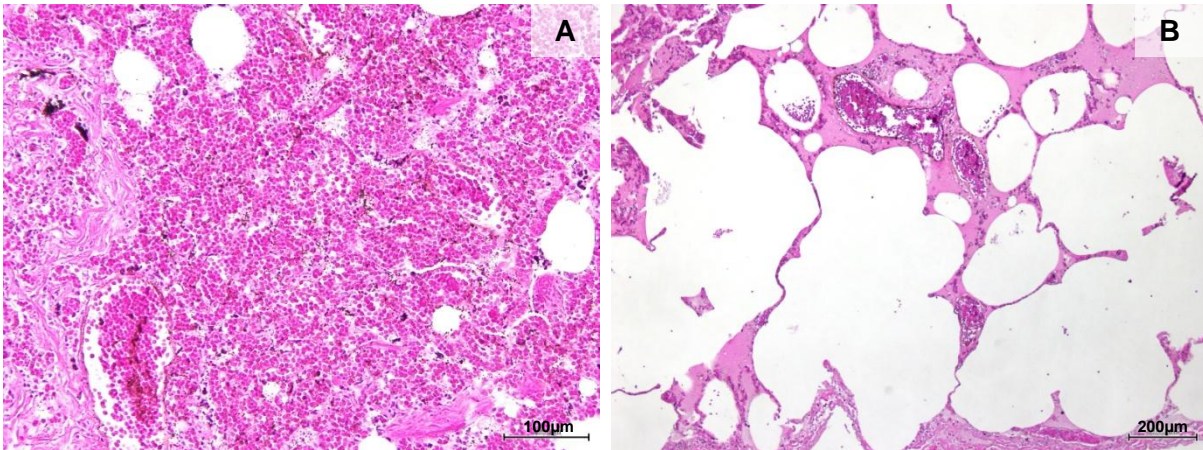
Figura 22 – Aspeto macroscópico do pulmão de *A. p. pusillus* (Caso 2) (fonte: Zoomarine).



Realizou-se o exame histopatológico de amostras de todos os órgãos, apresentando-se aqui os resultados mais relevantes. Os pulmões do Caso 1 (Figura 23) apresentavam lesões hemorrágicas (presença de sangue no lúmen dos alvéolos) e enfisema vicariante (distensão muito marcada dos alvéolos com adelgaçamento da sua parede). No Caso 2, no pulmão (Figura 24), verificou-se congestão a nível de vasos pulmonares que se estendia ao nível dos capilares dos septos interalveolares. Apresentava bronquite catarral, com repleção do lúmen dos brônquios por células de descamação e muco. Assim como, lesões de pneumonia exsudativa em fase de hepatização vermelha, com um exsudado serofibrinoso nos alvéolos, o qual em algumas áreas, se encontrava calcificado. Foram também observadas lesões de pneumonia intersticial, com presença de infiltrado intersticial por células linfóides e macrófagos.



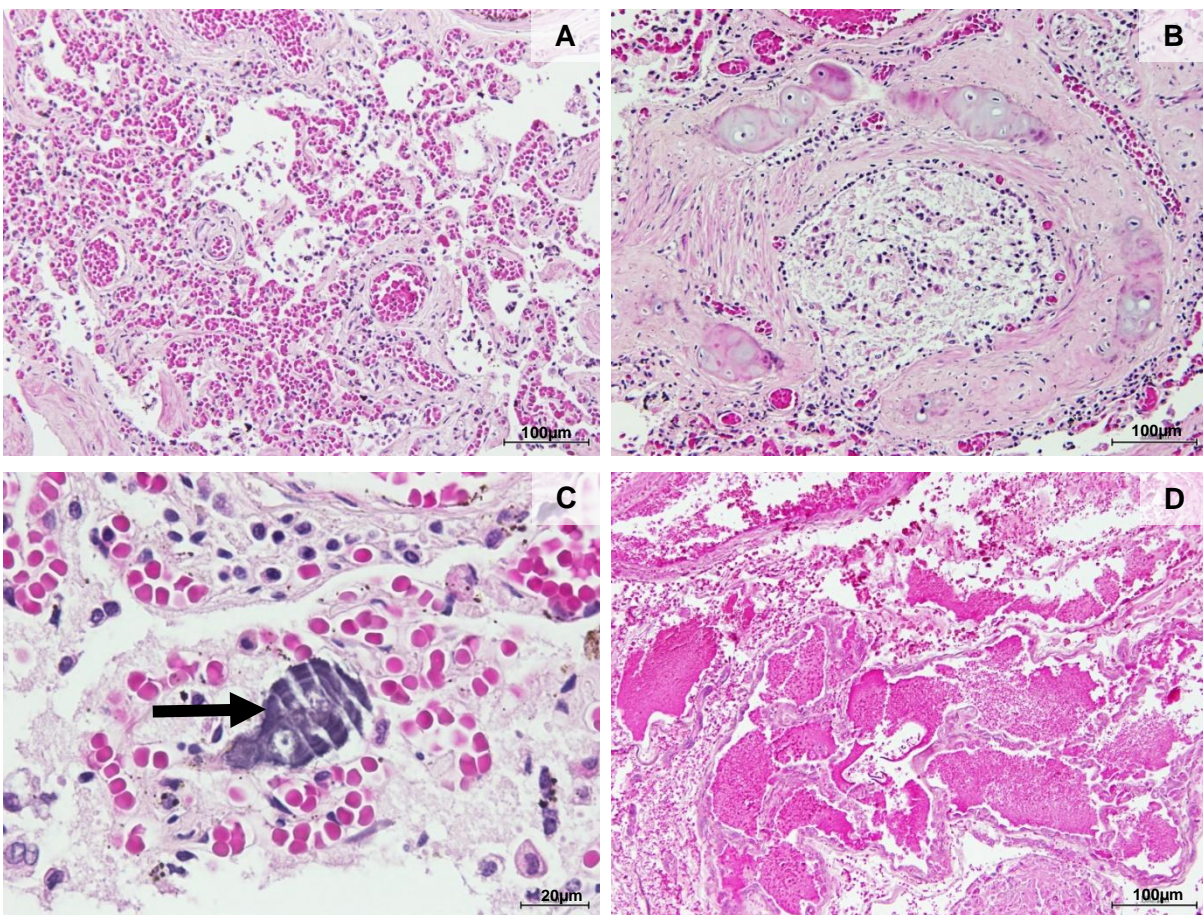
Figura 23 – Histopatologia de pulmão de *A. p. pusillus* (Caso 1) (original).



Legenda:

- A. Hemorragia pulmonar, verificando-se presença de sangue no lúmen dos alvéolos (H&E, 100x);
- B. Enfisema vesicular, podendo observar-se distensão muito marcada dos alvéolos e adelgaçamento das suas paredes (H&E, 40x).

Figura 24 – Histopatologia de pulmão de *A. p. pusillus* (Caso 2) (original).



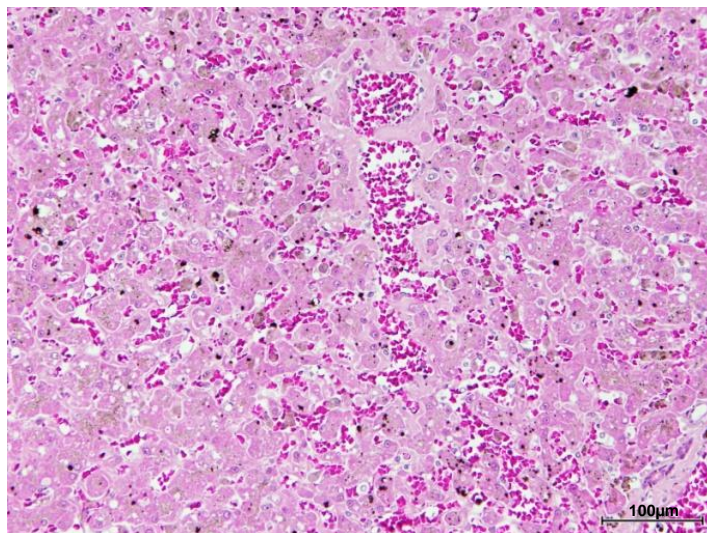
Legenda:

- A. Congestão a nível de vasos pulmonares que se estende aos capilares dos septos interalveolares (H&E, 100x);
- B. Bronquite catarral, observando-se o lúmen de um brônquio completamente obstruído (H&E, 100x);
- C. Pormenor de exsudado calcificado (seta) e presença de congestão nos vasos (H&E, 400x);
- D. Presença de exsudado serofibrinoso no lúmen dos alvéolos (H&E, 100x).



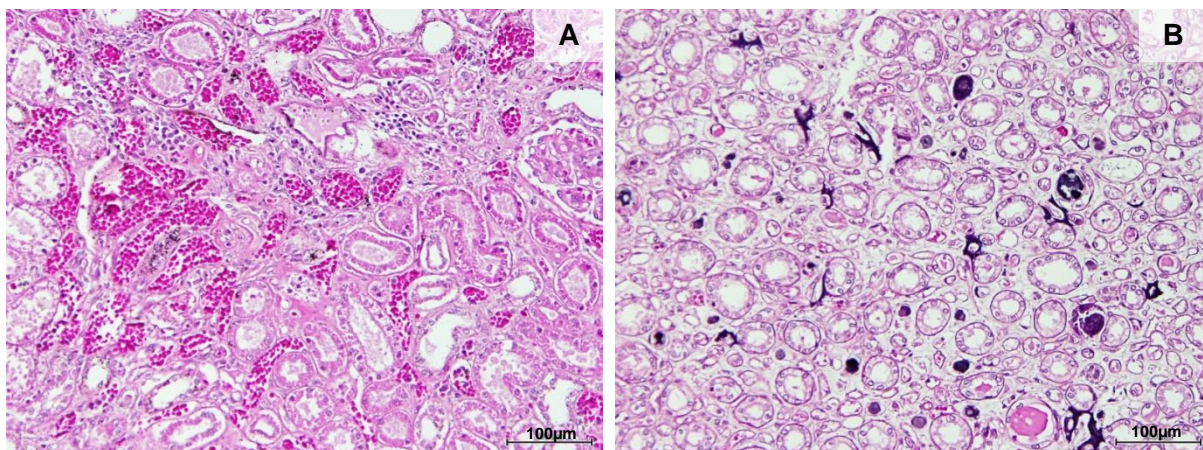
No fígado, a nível microscópico, confirmou-se a congestão observada aquando da necrópsia do Caso 2. Observou-se nos cortes histológicos, como se pode verificar na Figura 25, congestão passiva de distribuição zonal, afetando a zona centrolobular. Também foi possível observar degenerescência vacuolar.

Figura 25 – Histopatologia de fígado (Caso 2), denotando-se congestão (H&E, 100x) (original).



Novamente no Caso 2, registou-se congestão passiva nos rins (Figura 26A) e, ainda lesões características de urolitíase (Figura 26B), com presença de depósitos mineralizados no lúmen dos tubos e mesmo no interstício.

Figura 26 – Histopatologia de rim de *A. p. pusillus* (Caso 2) (original).

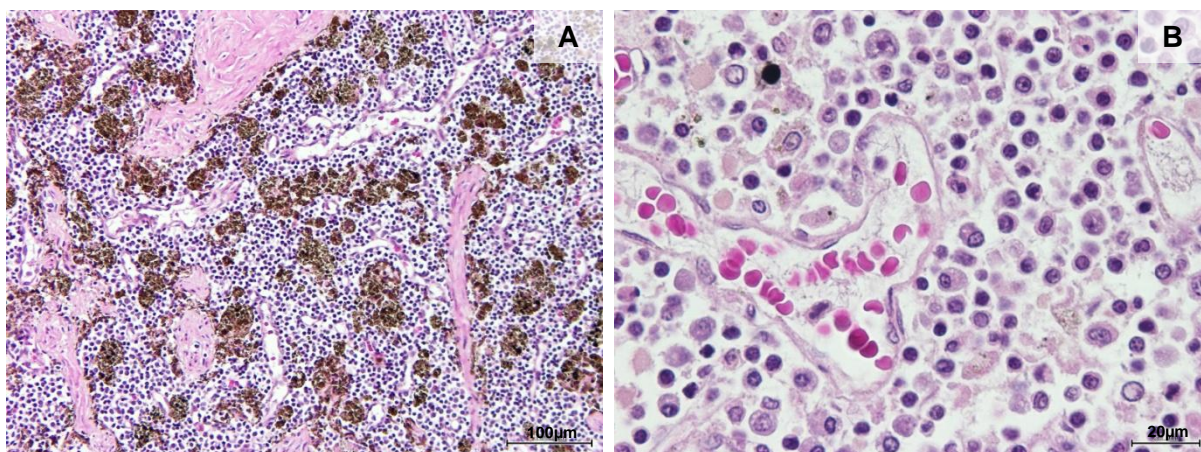


Legenda:

- A. Presença de congestão renal (H&E, 100x);
- B. Lesões de urolitíase, observando-se depósitos mineralizados no lúmen dos tubos e no interstício (H&E, 100x).

Por último, ao analisar os linfonodos mediastínicos (Figura 27), observou-se grande número de macrófagos e grande quantidade de pigmento – hemossiderina. Denotou-se uma hiperplasia linfoplasmocitária e presença de congestão.

Figura 27 – Histopatologia de linfonodos mediastínicos de *A. p. pusillus* (Caso 2) (original).



Legenda:

- A. Presença de grande quantidade de macrófagos e hemossiderina (H&E, 100x);
- B. Congestão e hiperplasia linfoplasmocitária (H&E, 400x).

### 3.5. Outros resultados

Para além das análises realizadas no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-UL, enviaram-se amostras sanguíneas (sangue total em EDTA) para realização de qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*), para a pesquisa de *D. immitis*, em dois dos animais, nos quais se obteve resultados positivos no teste rápido ou na técnica de Knott (uma foca-comum e a otária sul-africana). Ambos os qPCR foram negativos, como se pode verificar no Anexo 4. Foi também enviada uma amostra de soro da otária sul-africana, na qual foi realizado um teste imunológico: ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), para detetar antígeno de *D. immitis*. O resultado foi negativo com ligeira reação (Anexo 4).

### 3.6. Resumo dos resultados gerais

Na Tabela 7, apresentam-se os resultados positivos gerais para *D. immitis* dos vários métodos de diagnóstico, utilizados na presente dissertação, incluindo-se a respetiva prevalência e limites de prevalência a um intervalo de confiança de 95% [IC 95%].

Tabela 7 – Resumo dos resultados gerais obtidos (n=19).

Análise realizada	Frequência absoluta	Prevalência	IC 95%
Teste rápido	2	10,5%	0,19 – 31,6%
Técnica de Knott	1	5,3%	0,3 – 25,2%

No total, obteve-se dois resultados positivos para *D. immitis* em *Phoca vitulina* e um resultado positivo em *Arctocephalus pusillus pusillus*, sendo o total de prevalência três casos num total de 19, o que equivale a 15,8%.

Os resultados obtidos nos esfregaços sanguíneos corados por Giemsa não estão contemplados na tabela acima, devido às dúvidas encontradas nos resultados.

#### 4. Discussão

No total de animais da coleção de pinípedes do Zoomarine, dois da subespécie *Arctocephalus p. pusillus* estavam parasitados por vermes adultos de *Dirofilaria immitis* e outro por microfilárias, eventualmente desta ou de outra espécie.

Devido à presença de parasitas no coração e artéria pulmonar identificados em necrópsias de dois pinípedes, houve a necessidade de testar todos os pinípedes da atual coleção zoológica presente no Zoomarine. Pelo facto de estes animais se encontrarem num parque zoológico localizado no Algarve, região endémica para Dirofilariose canina e felina (Cardoso *et al.*, 2012; Alho *et al.*, 2014a), a primeira hipótese colocada, foi a possibilidade destes animais poderem estar parasitados por *D. immitis*. Os testes de diagnóstico conduzidos foram baseados nesta premissa, não se podendo no entanto descartar outros vermes, porque alguns dos animais mais velhos ainda nasceram em ambiente selvagem.

Atendendo à inexistência de métodos de diagnóstico direcionados para a pesquisa de *D. immitis* em pinípedes e a falta de bibliografia relacionada com a mesma, recorreu-se aos métodos de diagnóstico utilizados para animais domésticos.

No total das amostras sanguíneas analisadas, obtiveram-se 10,5% (2/19) de casos positivos para o Teste Rápido WITNESS® *Dirofilaria* e 5,3% (1/19) de casos positivos para a Técnica de Knott, perfazendo um total de 15,8% de casos positivos (3/19). Os dois casos positivos no Teste Rápido, eram duas focas-comuns que não apresentavam sinais clínicos e cujos testes de Knott foram negativos. Pelo contrário, o único teste de Knott positivo surgiu numa otária sul-africana, cujo Teste Rápido foi negativo, mas que apresentava sinais de doença compatível com infeção por *D. immitis*: tosse e cansaço físico marcado. Estes três animais são dos animais mais velhos da coleção, as focas com 26 anos e a otária-sul-africana com 23 anos de idade.

O teste rápido, baseado em imunomigração rápida, deteta a presença de antígeno da fêmea adulta de *D. immitis*, no sangue do hospedeiro e é um dos testes mais utilizados em cães, por ser um método rápido, fácil e sensível (Alho *et al.*, 2014c). Este teste é fabricado, usualmente, para cães e gatos, como tal, não é específico para as espécies deste estudo, o que poderia resultar numa interferência com os resultados, embora os testes de pesquisa de antígenos sejam bastante específicos (American Heartworm Society, 2014).

Num cão, um teste positivo ao antígeno, sem deteção de microfilárias no teste de Knott, indica uma infeção amicrofilarémica por *D. immitis* (Simón *et al.*, 2012). Medway & Weiland



(1975), com um caso de *D. immitis* positivo em necrópsia em foca-comum, referem que aquando da análise ao sangue por métodos de concentração e também diretos, não se observou presença de microfilárias, sugerindo que, apesar de ser um caso baseado num só animal, que a amicrofilarémia pode resultar do facto de esta espécie não ser um hospedeiro natural, ou que o animal teria desenvolvido uma imunidade suficiente para inibir o desenvolvimento de microfilárias. Nos dois casos positivos do presente trabalho, foi detetado antígeno da fêmea de *D. immitis*, mas não microfilárias, sugerindo que estas duas focas tinham uma infeção por *D. immitis* amicrofilarémica.

Por outro lado, o resultado negativo no teste rápido da otária-sul-africana corresponde a um resultado positivo na técnica de Knott. Se o teste de Knott é positivo, mas o teste de antígeno é negativo num cão, considera-se que a infeção é causada por outra espécie que não *D. immitis*, o que pode ser confirmado através do teste das fosfatases ácidas ou por PCR (Simón *et al.*, 2012). No entanto, sabe-se que podem surgir falsos negativos nos testes rápidos, devido a infeções por apenas formas imaturas do parasita, apenas espécimes do sexo masculino ou ainda, uma baixa carga parasitária (Alho *et al.*, 2014c), possíveis justificações para o resultado negativo observado no teste rápido.

De referir, que o teste das fosfatases ácidas foi realizado nos três animais com resultados positivos, mas não se observaram microfilárias nos esfregaços.

Para além dos testes rápidos realizados a toda a coleção presente do Zoomarine, utilizou-se soro armazenado dos dois animais das necrópsias com presença de parasitas, e o resultado foi positivo no Óbito 2, mas no Óbito 1, o resultado obtido foi negativo. No entanto, encontraram-se vermes adultos de ambos os sexos, em ambos os animais, que posteriormente foram identificados como *D. immitis*. Possivelmente, o resultado negativo deveu-se a uma menor carga parasitária, ou a um menor número de fêmeas presentes.

No único resultado positivo na Técnica de Knott, registado em otária-sul-africana, realizaram-se as medições das microfilárias encontradas, que mediam entre 300 a 305 µm de comprimento e 6 µm de diâmetro, apresentavam uma extremidade cefálica afunilada e cauda pontiaguda. Este valor e características são compatíveis com resultados encontrados no cão. O comprimento das microfilárias de *D. immitis* no cão é 290–330 µm e a extremidade cefálica é afunilada e a cauda reta e pontiaguda (Magnis *et al.*, 2013; Alho *et al.*, 2014b).

Forrester *et al.* (1973) realizaram a medição de microfilárias encontradas em leão-marinho-californiano e compararam com um cão experimentalmente infetado com *D. immitis*. Foram encontradas duas microfilárias diferentes, uma maior (285–290 µm), que correspondia a *D. immitis* e uma mais pequena (225–250 µm), correspondente a *Acanthocheilonema odendhali*. As microfilárias retiradas do cão mediam 280–315 µm (encontrando-se as de leão-marinho neste intervalo). O diagnóstico foi confirmado, pois o animal foi mais tarde

examinado após necrópsia e os parasitas adultos encontrados no coração correspondiam morfológicamente a *D. immitis*. Outra espécie cujas microfilárias podem estar presentes no sistema circulatório de pinípedes é *A. spirocauda*, com 203,37–250,38 µm de comprimento e 4,22–5,93 µm de largura para as suas pré-larvas L1 (Lehnert *et al.*, 2015). Estas são mais pequenas que as de *D. immitis*, tal como a já antes referida *A. odendhali*, descrita pela primeira vez por Perry (1967), cujas microfilárias medem 231–249 µm x 3,5 µm.

Os parasitas encontrados nas duas necrópsias foram identificados morfológicamente como *D. immitis*, com base em Furtado *et al.* (2010). Estes autores indicam que as fêmeas adultas medem entre 177–272 mm de comprimento e 0,40–0,61 mm de largura; e os machos medem 119,4–162,3 mm de comprimento e 0,3–0,5 mm de largura. No presente trabalho, as fêmeas adultas encontradas atingiram um comprimento entre 235 mm e 285 mm, com uma largura entre 0,7 mm e 1,0 mm. Os machos atingiram 150 mm. Em geral, as medidas apresentadas encontram-se dentro do intervalo apresentado por Furtado *et al.* (2010), sendo ligeiramente maiores alguns dos vermes encontrados.

Novamente, comparando as medidas de outros nemátodes cardiopulmonares que podem parasitar pinípedes, estes são mais pequenos que *D. immitis* e bastante mais pequenos que os vermes encontrados nas necrópsias. As fêmeas de *A. spirocauda* medem 97–197 mm de comprimento e 0,32–0,63 mm de largura, e os machos, 68–117 mm de comprimento e 0,29–0,39 mm de largura (Leidenberger & Boström, 2008). As diferenças morfológicas entre *D. immitis* e *A. spirocauda* podem ser consultadas no Anexo 3.

De referir ainda, um nemátode pulmonar, que ocasionalmente também pode ser encontrado nas câmaras cardíacas direitas e artérias pulmonares (Onderka, 1989; Bergeron *et al.*, 1997b; Gulland *et al.*, 1997), *Otostrongylus circumlitus*, cujas fêmeas atingem 32–140 mm de comprimento e 0,64–2,4 mm de largura, e os machos 30–115 mm de comprimento e 0,53–1,3 mm de largura (Measures, 2001), sendo também mais pequenos quando comparados com *D. immitis*.

No presente trabalho, não se obteve sucesso na identificação molecular dos vermes adultos encontrados nas necrópsias, pois os vermes estavam muito deteriorados. Esta análise molecular seria uma mais-valia no trabalho, para ter uma dupla confirmação do diagnóstico.

Relativamente às análises realizadas em laboratório externo, o qPCR de uma das focas-comuns com Teste Rápido WITNESS® *Dirofilaria* positivo, teve um resultado negativo (não foi detetado ADN de *D. immitis* na amostra enviada). Para a otária sul-africana com teste de Knott positivo, realizou-se qPCR, cujo resultado foi negativo (não foi detetado ADN de *D. immitis* na amostra enviada), e um teste ELISA (titulação 1/32), para deteção de antígeno de *D. immitis*, também sendo o resultado negativo (ligeira reação) (ver Anexo 4).

Se o PCR teve um resultado negativo, pode significar que o parasita presente não é *D. immitis*. No entanto, esta técnica tem limitações. A polimerase do ADN usada na reação de PCR é propensa a erros que podem levar a mutações no fragmento gerado. A especificidade do produto de PCR gerado pode ser alterada, por ligação não específica de *primers*, a outras sequências semelhantes do *template* do ADN. Ainda, para a criação de *primers* para PCR, é necessário alguma informação prévia da sequência genética. Deste modo, o PCR apenas pode ser usado para identificar a presença ou ausência de um gene ou agente patogénico conhecidos (Garibyan & Avashia, 2013).

Excluindo a hipótese de erro humano, um possível falso negativo poderá dever-se a que a quantidade de *D. immitis* está demasiado baixa e não atinge o limiar de deteção. A especificidade do *primer* pode não ser a melhor para os parasitas destas espécies de pinípedes, porque podemos estar perante uma estirpe/subespécie de *D. immitis*, diferente da do cão, o que significa que a zona genómica alvo dos *primers*, pode não ser comum entre cães e pinípedes.

O resultado negativo, mas com uma ligeira reação, no teste de imunologia, pode indicar que o animal pode ter antígeno de *D. immitis*, mas numa quantidade muito diminuta, que não é corretamente detetada no teste.

Todos os fatores envolventes corroboram os resultados obtidos neste trabalho, mesmo com algumas dúvidas presentes, devido à ausência de referências. A Dirofilariose é uma doença com distribuição mundial, que tem vindo a crescer em prevalência e incidência nas últimas décadas, seja em animais ou humanos (Alho *et al.*, 2014b). Esta poderá ser também uma realidade em parques zoológicos, como é o exemplo do presente trabalho. No entanto, não só as espécies em estudo são infetadas por este parasita, como também há casos relatados em leopardo-das-neves, leão e panda-vermelho, no Japão, em Espanha e na China, respetivamente (Murata, Yanai, Agatsuma & Uni, 2003; Ruiz de Ybanez *et al.*, 2006; Lan *et al.*, 2012).

No caso particular de Portugal, a Dirofilariose é endémica/hiperendémica, tal como outros países mediterrânicos, devido às suas condições geográficas e climatéricas. A cidade de Faro, a mais próxima do Zoomarine, foi a segunda cidade/zona com maior número de dias com condições ideais para a transmissão de *Dirofilaria*, 175,2 dias por ano. A média do período sazonal de risco para transmissão de *Dirofilaria* spp. foi de 6,9 meses/ano em Faro (Alho *et al.*, 2014a).

Num estudo efetuado em Portugal, foram observadas prevalências para *D. immitis* de 3,6% em cães aparentemente saudáveis e 8,9% em cães suspeitos de doenças caninas de transmissão vetorial (CVBD). No Algarve, a prevalência em cães aparentemente saudáveis atingiu 5,1%, e em cães suspeitos de CVBD, observou-se uma prevalência de 17,1%, sendo estas as prevalências mais altas do continente português (Cardoso *et al.*, 2012).

O desenvolvimento, colonização e atividade dos mosquitos vetores de *D. immitis*, são regulados pelo clima, principalmente temperatura e humidade, sendo que a temperatura também influencia o desenvolvimento das larvas L3 dentro dos mosquitos (Simón *et al.*, 2012). Sendo o Algarve uma zona endémica com prevalências altas e uma época de risco de infeção mais alargada, e encontrando-se o Zoomarine a cerca de 4 km de distância da Lagoa dos Salgados, que é uma zona de sapais, com as condições ideais para o desenvolvimento dos vetores, é de esperar os resultados obtidos neste trabalho.

Outra razão a juntar às anteriores, é o aparecimento destes casos no parque, após vários anos sem a existência de uma profilaxia específica na coleção para Dirofilariose. E apesar da existência de uma empresa externa responsável pelo controlo de pragas, incluindo de mosquitos, este pode não ser um método de prevenção suficiente para impedir a infeção dos pinípedes do Zoomarine por *D. immitis*.

Sabendo que os parasitas encontrados nas necrópsias foram identificados como *D. immitis*, pode significar que efetivamente há presença do parasita e infeção na zona do Zoomarine. Vários autores reportaram casos de *D. immitis* em pinípedes em parques zoológicos situados em áreas endémicas (Forrester *et al.*, 1973; Medway & Weiland, 1975; White, 1975; Lauckner, 1985; Dailey, 2001; Sato *et al.*, 2002).

À semelhança da Dirofilariose, também outras doenças cujos agentes sejam transmitidos por mosquitos podem ser importantes noutros animais pertencentes a jardins ou parques zoológicos, como por exemplo *Plasmodium* spp., como agentes de malária aviária em pinguins, inclusivamente já diagnosticada em Portugal em contexto de coleção zoológica (Alves, 2002; Grilo, 2014).

No entanto, e tal como referido anteriormente, não se pode descartar desde o início, a existência de uma outra espécie de parasita. Os outros nemátodes cardiopulmonares que afetam pinípedes são *Acanthocheilonema spirocauda* e *A. odendhali*. Por todas as considerações antes referidas, não é muito provável que estes nemátodes constituíssem o diagnóstico correto. Para além das características biológicas previamente apresentadas, *A. spirocauda* afeta apenas focídeos (maioritariamente animais no primeiro ano de vida e imaturos, no ambiente selvagem), em climas mais frios e o seu provável vetor é um piolho, cujo habitat é a zona holártica (Leidenberger *et al.*, 2007). Ora, os animais parasitados pertencem à subespécie *Arctocephalus pusillus pusillus*, que é um otariídeo. Também, dois indivíduos com resultados positivos pertencem à espécie *Phoca vitulina*, na qual já foi reportado este parasita. No entanto, todos estes animais do presente trabalho são adultos de idade mais avançada, assim como os dois animais analisados em necrópsia, e vivem em contexto zoológico. Outra questão é a presença do vetor, que no Zoomarine nunca antes foi registada, porque não se situa numa zona de clima frio. Para *A. odendhali*, os adultos situam-se na fáscia intermuscular e cavidades torácica e abdominal, e não no coração (Perry, 1967). Para além das características biológicas apresentadas anteriormente para

este parasita, é de referir, que apenas foram registados casos na costa oeste da América do Norte (Forrester *et al.*, 1973), e nunca nas espécies com resultados positivos (*P. vitulina* e *A. p. pusillus*) contempladas no presente trabalho.

Contudo, para poder rejeitar totalmente a hipótese de parasitismo por estes parasitas, seria vantajoso realizar PCR, mas tal não foi possível devido a impedimentos técnicos e económicos.

No que respeita às lesões macroscópicas e microscópicas encontradas na necrópsia de animais parasitados, estas variam entre diversos trabalhos. No entanto, a localização dos parasitas adultos é sempre semelhante: ventrículo direito e artéria pulmonar. No Caso 1 (14/11/13), os vermes localizavam-se no ventrículo direito e grandes vasos, e no Caso 2 (21/10/14), na artéria pulmonar, à semelhança do referido em Forrester *et al.* (1973), White (1975) e Sato *et al.* (2002). É de referir, que na presente dissertação, nenhum dos dois animais apresentava sinais de doença pulmonar ou cardíaca, e que em média o número de parasitas encontrados na necrópsia rondou entre os 10 e 15. Apenas White (1975) refere a presença de sinais clínicos antes da morte (tosse, movimentos respiratórios alterados, pouca atividade física, períodos intermitentes de anorexia, perda de peso). As cargas parasitárias dos animais nos estudos variaram, pois Forrester *et al.* (1973) referem entre 6, 9 e 23 vermes; White (1975) refere 7 a 27 vermes; e foi encontrada uma carga parasitária bastante alta (166 vermes) em Sato *et al.* (2002). Tal como o presente trabalho, nos três estudos referidos, os animais encontravam-se em zonas endémicas para *D. immitis* e caracterizavam-se por ser animais adultos ou de idade mais avançada.

Quanto às alterações patológicas, Sato *et al.* (2002) descreveram hipertrofia ventricular direita, congestão e edema do pulmão, com líquido espumoso nos bronquíolos. A hipertrofia ventricular direita não se observou nem no Caso 1 (14/11/13), nem no Caso 2 (21/10/14).

Histologicamente, as lesões encontradas no estudo de Forrester *et al.* (1973) foram arterite da artéria pulmonar e trombose pulmonar, o fígado apresentava evidências de congestão centro-lobular, dilatação dos sinusoides e fibrose. White (1975) descreve uma congestão crónica passiva presente em todos os animais do estudo, alguma dilatação das câmaras direitas do coração, o pulmão apresentava congestão pulmonar e lesões de pneumonia intersticial e, ainda, congestão crónica passiva no fígado e rins, a nível macroscópico e microscópico.

À semelhança dos dois trabalhos anteriores, nas duas necrópsias deste estudo, observou-se congestão pulmonar. No Óbito 2, também congestão do fígado e rins, como White (1975), denotando-se congestão passiva de distribuição zonal, afetando a zona centrolobular, semelhante a Forrester *et al.* (1973).

Os pulmões de ambos os animais do presente trabalho, apresentavam também lesões de bronquite catarral e pneumonia exsudativa e, no Óbito 1, hemorragia e enfisema também.

Nos linfonodos mediastínicos do Óbito 2, observou-se um grande número de macrófagos e grande quantidade de pigmento – hemossiderina, que poderá ser consequência de alterações vasculares, devido à pneumonia presente. Concluindo, estes dois animais tinham lesões que podem ser associadas à presença do parasita, mas não em grande extensão.

Nos esfregaços sanguíneos corados por Giemsa, detetaram-se estruturas identificadas como sendo *Mycoplasma* sp. hemotrófico. Este método de diagnóstico, juntamente com a técnica de PCR, são o *gold standard* para a detecção destas infecções (Willi *et al.*, 2007). No presente trabalho apenas se analisaram esfregaços sanguíneos. Sendo que, foram encontradas algumas dúvidas nos resultados, é importante confirmar o diagnóstico. A confirmação deve ser realizada através de um método molecular, como o PCR ou RT-PCR, com uma amostra sanguínea dos animais. Como anteriormente referido, pouco ou nada se conhece sobre hemoplasmas em pinípedes, sendo Volokhov *et al.* (2011), a única referência disponível. À semelhança deste estudo, os pinípedes do presente trabalho não apresentam sinais clínicos associados ao *Mycoplasma*, isto é, anemia. Tal como o autor refere, isto pode dever-se à baixa patogenicidade da espécie de hemoplasma no hospedeiro ou uma adaptação entre o hospedeiro e o hemoplasma.

Quanto às vias de transmissão destes *Mycoplasma* spp. em pinípedes, ainda não são conhecidas e apenas várias hipóteses são sugeridas. Volokhov *et al.* (2011) propõe a hipótese de *E. horridus* como vetor, pois os animais positivos tinham uma coinfeção com uma espécie de *Acanthocheilonema*. No presente estudo, alguns dos animais encontravam-se parasitados por *D. immitis*, cujo vetor é um mosquito; deste modo, e tendo em conta que os três animais suspeitos de infecção por *D. immitis* têm um resultado positivo para *Mycoplasma* spp. nos esfregaços sanguíneos, surge a hipótese da transmissão de *Mycoplasma* se realizar também através de um mosquito.

Para a confirmação dos resultados obtidos no presente trabalho, foi estabelecido um contacto com os autores da única referência publicada (Volokhov *et al.*, 2011), que irão analisar amostras sanguíneas da coleção de pinípedes do Zoomarine através de técnicas moleculares (PCR).

Por último, as análises fecais, na sua totalidade, foram consideradas negativas, ou seja, não se detetaram ovos de nemátodes, céstodes, tremátodes e acantocéfalos, nas técnicas de McMaster, flutuação de Willis e sedimentação em meio saturado; e não se detetaram larvas de nemátodes pulmonares na técnica de Baermann, nem protozoários nos esfregaços fecais corados pela técnica de Ziehl-Neelsen.

Em pinípedes no ambiente selvagem são encontrados nemátodes, céstodes, tremátodes e acantocéfalos de forma habitual (Van Bonn, 2014). No entanto, para pinípedes em parques zoológicos não há muita informação descrita. Apesar de ainda não totalmente conhecidos, a

maioria dos ciclos de vida destes parasitas são indiretos e requerem um hospedeiro intermediário, geralmente peixes e pequenos crustáceos (Van Bonn, 2014). Assim sendo, a origem da infecção num parque zoológico, teria de surgir da existência de um hospedeiro intermediário. Quando inseridos numa coleção, pinípedes que venham de um habitat selvagem e se encontrem parasitados, se nenhum hospedeiro intermediário está presente nos alojamentos dos animais, a infecção resolver-se-á ao longo do tempo e com uma resposta imunitária apropriada do hospedeiro (Van Bonn, 2014).

Sendo os hospedeiros intermediários peixes e pequenos crustáceos, que fazem parte da alimentação dos pinípedes, uma das possíveis vias de transmissão seria a alimentação. Em parques zoológicos, incluindo o Zoomarine, os pinípedes são alimentados com peixe que previamente foi congelado. Measures (2014) refere que a congelação comercial rápida do peixe, poderá matar as larvas de nemátodes da família *Anisakidae*. Também para nemátodes pulmonares, Measures (2001) refere que em meio zoológico não há registo de pinípedes estarem infetados, devido à congelação a que os peixes dados como alimento, são submetidos, a qual pode matar as larvas destes parasitas. Ainda Van Bonn (2014) refere que os animais em contexto zoológico são alimentados com peixe congelado, sendo que os parasitas morrem devido à congelação e assim estes animais não serão infetados novamente.

Apenas um nemátode gastrointestinal, *Uncinaria* sp., tem um ciclo de vida direto (Dailey, 2005; Raga *et al.*, 2009; Lyons *et al.*, 2011b). Foi demonstrado que as larvas L3 podem viver e são viáveis até seis anos na camada subcutânea de uma fêmea infetada. E que os nemátodes adultos persistem nos intestinos das crias apenas por curto tempo, cerca de seis a oito semanas (Lyons *et al.*, 2011b).

No grupo de pinípedes existente no Zoomarine, os resultados negativos obtidos eram de esperar, pelas razões acima apresentadas. Estes animais já estão no parque há muitos anos, durante os quais, foram realizadas ações profiláticas, nomeadamente com desparasitação interna. E se não há a existência de hospedeiro intermediário infetado pelo parasita, não há uma fonte de infecção para os pinípedes da coleção. No que concerne a *Uncinaria* spp., tendo em conta o tempo de vida do parasita, é muito pouco provável que, se alguma fêmea tivesse chegado parasitada ao parque, ainda mantivesse a infecção nos dias de hoje e, adicionando a essa razão, a desparasitação realizada em tempos, menos provável seria a sua ocorrência.

No presente estudo, em todos os esfregaços fecais examinados não se detetaram trofozoítos/quistos de *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium*. Num estudo de pinípedes (leões-marinhos-australianos – *Neophoca cinerea*) em ambiente zoológico e ao contrário do presente trabalho, foi reportada uma presença de *Giardia duodenalis* significativamente maior em animais provenientes de zoo, com uma prevalência de 36,8%, quando comparados com animais do meio selvagem, com 10,3% de prevalência, o que pode

resultar de um maior e mais próximo contacto com humanos e maior densidade animal (Delpont *et al.*, 2014). Isto porque, os *assemblages* detetados foram A e B, os que usualmente estão associados a humanos. Ainda neste estudo, os vários locais de proveniência dos pinípedes, tinham vários níveis de programas de interação com o público, nos quais, por exemplo, as pessoas podiam nadar com os animais ou tocá-los. Desta forma, esta exposição aos humanos, que usualmente não ocorre no ambiente selvagem, pode aumentar o risco de transmissão de *Giardia* spp., em ambientes zoológicos. Outro estudo (Thompson *et al.*, 2008), que testou marsupiais alojados em vários parques zoológicos e detetou igualmente os *assemblages* A e B, relata que estes animais podem estar expostos a *Giardia* através do contacto humano durante a alimentação à mão ou pelo toque dos visitantes, os dois tipos de interação existentes nos parques analisados. Tendo em conta que na presente dissertação os resultados foram considerados negativos, tal poderá ser justificável, pelo facto de o contacto dos pinípedes da coleção do Zoomarine com pessoas ser muito reduzido e restrito, apenas contactando com treinadores e equipa veterinária, exceto em alguns casos pontuais.

Por outro lado, nos estudos acima mencionados os métodos de diagnóstico diferem dos do presente trabalho. Delpont *et al.* (2014) utilizaram PCR nas amostras fecais, assim como, Thompson *et al.* (2008), que nas suas amostras positivas, realizaram microscopia das amostras fecais, previamente concentradas em flutuação de zinco e examinadas numa ampliação de 400x com contraste de fase. Em 57 casos positivos para PCR, apenas 26 foram positivos na microscopia, indicando uma maior sensibilidade na deteção por PCR. Outra razão que os autores apresentam, para este resultado, é o facto da excreção de *Giardia* ser muitas vezes baixa, o que dificulta o seu diagnóstico através de microscopia. Outro método utilizado em vários estudos, que incidiram em populações de pinípedes selvagens e com resultados positivos foi a Imunofluorescência Direta (Olson *et al.*, 1997; Measures & Olson, 1999; Appelbee *et al.*, 2010). No entanto, Appelbee *et al.* (2010), refere a maior sensibilidade do PCR quando comparado com a Imunofluorescência. Os resultados demonstram uma subestimativa da prevalência de *Giardia* sp. nas espécies analisadas no estudo, assim como em outros trabalhos, que utilizem apenas a análise microscópica das amostras fecais (Appelbee *et al.*, 2010). Na presente dissertação, seria uma mais valia confirmar os resultados negativos obtidos através da análise dos esfregaços fecais corados pela técnica de Ziehl-Neelsen, através das técnicas acima mencionadas. Não foi possível a contemplação da realização destas técnicas neste estudo, devido a impossibilidades técnicas e económicas.

Relativamente a *Cryptosporidium*, este parasita é reportado em menor frequência que *Giardia*, em populações de mamíferos marinhos (Appelbee *et al.*, 2005, 2010; Delpont *et al.*, 2014). No estudo referido anteriormente (Delpont *et al.*, 2014), nos mesmos animais nos parques zoológicos e também nos de vida selvagem, não se detetou um único resultado



positivo de *Cryptosporidium* utilizando PCR. Apesar da técnica utilizada na presente dissertação (esfregaço fecal com coloração álcool-ácido-resistente) ser distinta, os resultados obtidos assemelham-se a este estudo.

A desinfecção da água é atingida através de desinfetantes químicos ou físicos, sendo que o mais comum é o cloro. As espécies do género *Giardia* são mais resistentes que as bactérias a tal desinfecção, mas é possível matar os quistos com uma concentração mais alta de desinfetante e um maior tempo de contacto. O mesmo não se pode afirmar para as do género *Cryptosporidium*, pois são dos organismos mais resistentes aos desinfetantes na água, e mesmo após 18 horas de contacto com cloro a níveis muito elevados, não se observou a sua inativação (Betancourt & Rose, 2004). No Zoomarine, a desinfecção da água das piscinas pode justificar o resultado negativo obtido para *Giardia* sp., não se podendo afirmar o mesmo para *Cryptosporidium* sp.

Não se pode rejeitar a hipótese da existência de resultados falsos negativos na pesquisa de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. nesta coleção, não só devido à menor sensibilidade da técnica utilizada, mas também pela possível baixa eliminação das formas de desenvolvimento exógeno destes parasitas.

A presença de *Giardia* sp. em coleções zoológicas de mamíferos marinhos é pouco observada ou mesmo investigada. A pesquisa deste parasita noutras coleções, nas quais se realize interação com humanos, à semelhança do presente estudo, poderia fornecer mais informação sobre a transmissão em ambientes zoológicos (Delport *et al.*, 2014). Por sua vez, isto pode revelar potenciais vias de dispersão de *Giardia* sp. em parques zoológicos, e por dedução, potenciais estratégias de mitigação para a melhoria do manejo (Delport *et al.*, 2014). Assim, seria interessante, num futuro trabalho, fazer uma nova pesquisa especialmente direccionada para *Giardia* sp. e também *Cryptosporidium* sp. na coleção do Zoomarine, para verificar se pode existir presença destes parasitas, ou se a ausência destes é efetivamente o resultado de um bom manejo da coleção de pinípedes e dos seus habitats no parque.

## V. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

---

Atingidos os objetivos propostos para esta dissertação, e mesmo levantando-se muitas questões, verificou-se a existência de infecção por *Dirofilaria immitis* em pinípedes, num contexto zoológico.

Devido a todas as condições favoráveis de clima, temperatura e altas prevalências registadas em animais domésticos na zona do Algarve, o Zoomarine é o local ideal para a ocorrência desta parasitose. Assim, e tendo em conta que não se realiza qualquer tipo de profilaxia nos animais presentes na coleção, há um maior risco de estes serem infetados. Tal verificou-se, pois três pinípedes da presente coleção encontram-se parasitados e detetaram-se vermes adultos de *D. immitis* em duas necrópsias nos últimos dois anos.

Do conhecimento da autora desta dissertação e de acordo com a literatura consultada, este é o primeiro registo de *D. immitis* na subespécie *Arctocephalus pusillus pusillus*, a otária sul-africana, a nível mundial e é também o primeiro registo da infecção por este nemátode em pinípedes em Portugal, o que não só alarga o espetro de espécies hospedeiras, como amplia o conhecimento de ciclos biológicos não convencionais no âmbito regional, quiçá presentes noutras áreas do país onde existam outras coleções de pinípedes.

Mesmo sendo uma doença parasitária comum em animais domésticos e selvagens, ainda falta muito por descobrir em relação a Dirofilariose, principalmente em pinípedes e outros animais selvagens, em parques zoológicos.

Para além destes resultados, verificou-se a presença de um *Mycoplasma* sp. hemotrófico no sangue de alguns dos animais da coleção. Devido à incerteza da presença deste hemoplasma no sangue de pinípedes, apenas observado em esfregaços sanguíneos, é necessário realizar outros testes de diagnóstico que possam confirmar este resultado. O mesmo ocorre com os protozoários investigados no presente trabalho, que seria de maior interesse perceber se se trata de uma ausência real dos parasitas, ou um resultado falso negativo devido à diminuída sensibilidade dos métodos utilizados.

Devido à escassa informação publicada, e tendo em conta que existem ainda questões por responder, será interessante dar continuidade a este trabalho e tentar esclarecer os efeitos que todos estes parasitas têm nestes animais.

Por fim, é importante salientar a importância extrema da medicina preventiva nestes animais em contexto zoológico. Percebendo de que forma estes parasitas infetam e afetam os seus hospedeiros, no futuro poderá ser possível investigar e aplicar uma profilaxia específica de espécie, para a prevenção da doença, cumprindo assim os objetivos maiores da medicina preventiva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Alho, A M., Nabais, J. & Carvalho, L. M. (2013). A importância da Técnica de Baermann na clínica de pequenos animais. *Clínica Animal*, 1 (3), 28 – 31.
- Alho, A.M., Nunes, T., Rinaldi, L., Meireles, J., Belo, S., Deplazes, P., & Madeira de Carvalho, L. (2014a). Transmission risk of *Dirofilariosis* in Portugal. *Parasites & Vectors*, 7(Suppl 1), O16.
- Alho, A.M., Meireles, J., Belo, S. & Madeira de Carvalho, L.M. (2014b). *Dirofilariose* canina e felina, uma parasitose em evolução (I) – etiologia, biologia e epidemiologia. *Clínica Animal* nº3/2013, 2(2), 20-25.
- Alho, A.M., Meireles, J., Belo, S. & Madeira de Carvalho, L.M. (2014c) *Dirofilariose* canina e felina, uma parasitose em evolução (II) - fisiopatologia, diagnóstico e terapêutica. *Clínica Animal* nº5/2014, 3, 26-32.
- Alho, A. M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Gonçalves, L., de Carvalho, L. M., & Belo, S. (2014d). Prevalence and seasonal variations of canine *dirofilariosis* in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 206(1-2), 99–105.
- Alves, A.C.R. (2002). *Estudos de Malária Aviária em pinguins da espécie Spheniscus demersus no Jardim Zoológico de Lisboa*. Dissertação de Mestrado em Parasitologia Médica. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa.
- American heartworm Society [AHS] (2014). Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Infection in Dogs. EUA: AHS. Acedido a Nov., 20 de 2015. Disponível em: <https://www.heartwormsociety.org/veterinaryresources/american-heartworm-society-guidelines>.
- Anderson, R.C. (2001). Filarioid nematodes. In W.M. Samuel, M.J. Pybus & A.A. Kocan (Eds.), *Parasitic diseases of wild mammals*. (2nd ed.). (pp.342-356). Ames: The Iowa State University Press.
- Appelbee, A.J., Thompson, R.C. & Olson, M. E. (2005). *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - Current status and future needs. *Trends in Parasitology*, 21(8), 370–376.
- Appelbee, A.J., Thompson, R.C., Measures, L. M., & Olson, M. E. (2010). *Giardia* and *Cryptosporidium* in harp and hooded seals from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Veterinary Parasitology*, 173(1-2), 19–23.
- Arkush, K.D. (2001). Water quality. In L.A. Dierauf & F.M.D. Gulland (Eds.), *CRC Handbook of marine mammal medicine*. (2nd ed.). (pp.779-790). Boca Raton: CRC Press.
- Arnould, J.P.Y. (2009). Southern Fur seals, *Arctocephalus* spp. In W.F. Perrin, B. Würsig & J.G.M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. (2nd ed.). (pp.1079-1084). Burlington: Academic Press.
- Bass, A.L., Wallace, C.C., Yund, P.O. & Ford, T.E. (2012). Detection of *Cryptosporidium* sp. in two new seal species, *Phoca vitulina* and *Cystophora cristata*, and a novel *Cryptosporidium* genotype in a third seal species, *Pagophilus groenlandicus*, from the Gulf of Maine. *Journal of Parasitology*, 98, 316–322.

- Bergeron, E., Measures, L.N. & Huot, J. (1997a). Experimental transmission of *Otostongylus circumlitus* (Railliet, 1899) (*Metastrongyloidea: Crenosomatidae*), a lungworm of seals in eastern arctic Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 75, 1364–1371.
- Bergeron, E., Measures, L.N. & Huot, J. (1997b). Lungworm (*Otostongylus circumlitus*) infections in ringed seals (*Phoca hispida*) from eastern arctic Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 2443–2448.
- Berta, A. & Churchill, M. (2012). Pinniped taxonomy: review of currently recognized species and subspecies, and evidence used for their description. *Mammal Review*, 42(3), 207–234.
- Berta, A. (2009). Pinnipedia, Overview. In W.F. Perrin, B. Würsig & J.G.M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. (2nd ed.). (pp.878–885). Burlington: Academic Press.
- Berta, A. (2012). *Return to the sea: the life and evolutionary times of marine mammals*. California: University of California Press.
- Berta, A., Sumich, J.L. & Kovacs, K.M. (2015). *Marine mammals: evolutionary biology*. (3rd ed.). Burlington: Academic Press.
- Betancourt, W.Q. & Rose, J.B. (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology*, 126, 219–234.
- Bogomolni, A.L., Gast, R.J., Ellis, J.C., Dennett, M.R., Pugliares, K.R., Lentell, B.J. & Moore, M.J. (2008). Victims or vectors: a survey of marine vertebrate zoonoses from coastal waters of the Northwest Atlantic. *Diseases of Aquatic Organisms*, 81, 13–38.
- Bowen, W.D., Beck, C.A. & Austin, D.A. (2009). Pinniped ecology. In W.F. Perrin, B. Würsig & J.G.M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. (2nd ed.). (pp.852–860). Burlington: Academic Press.
- Bowman, D. (2014). *Georgis' parasitology for veterinarians*. (10th ed.). Missouri: Saunders Elsevier.
- Brock, P.M., Hall, A.J., Goodman, S.J., Cruz, M. & Acevedo-Whitehouse, K. (2013) Applying the tools of ecological immunology to conservation: a test case in the Galapagos sea lion. *Animal Conservation*, 16, 19–31.
- Burns, J.J. (2009). Harbor seal and spotted seal, *Phoca vitulina* and *P. largha*. In W.F. Perrin, B. Würsig & J.G.M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. (2nd ed.). (pp.533–542). Burlington: Academic Press.
- Cardoso, L., Mendão, C., & Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasites & Vectors*, 5(1), 62.
- Carlson-Bremer, D., Johnson, C.K., Miller, R.H., Gulland, F.M.D., Conrad, P.A., Wasmuth, J.D. & Grigg, M.E. (2012a). Identification of two novel coccidian species shed by California sea lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Parasitology*, 98(2), 347–354.
- Carlson-Bremer, D.P., Gulland, F.M.D., Johnson, C.K., Colegrove, K.M. & Van Bonn, W.G. (2012b). Diagnosis and treatment of *Sarcocystis neurona*-induced myositis in a free-ranging California sea lion. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(3), 324–328.

- Casemore, D.P., Armstrong, M., & Sands, R.L. (1985). Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 38, 1337–1341.
- Casiraghi, M., Anderson, T.J., Bandi, C., Bazzocchi, C. & Genchi, C. (2001). A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. *Parasitology*, 122, 93–103.
- Colegrove, K.M., Grigg, M.E., Carlson-Bremer, D., Miller, R.H., Gulland, F.M.D., Ferguson, D.J.P. & Conrad, P.A. (2011). Discovery of three novel coccidian parasites infecting California sea lions (*Zalophus californianus*), with evidence of sexual replication and interspecies pathogenicity. *Journal of Parasitology*, 97(5), 868–877.
- Dailey, M.D. (1970). The transmission of *Parafilaroides decorus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 37, 215–222.
- Dailey, M.D. (2001). Parasitic diseases. In L.A. Dierauf & F.M.D. Gulland (Eds.), *CRC Handbook of marine mammal medicine*. (2nd ed.). (pp.357-379). Boca Raton: CRC Press.
- Dailey, M.D. (2005). Parasites of Marine Mammals. In K. Rohde (Ed.) *Marine Parasitology*. (pp.408-414). Wallingford: CAB International.
- Dailey, M.D. (2006). Restoration of *Parafilaroides* (Dougherty, 1946) (Nematoda: Metastrongyloidea) with description of two new species from pinnipeds of eastern central Pacific. *Journal of Parasitology*, 92(3), 589–594.
- Dailey, M.D. (2009). A new species of *Parafilaroides* (Nematoda: Filaroididae) in three species of fur seals (*Carnivora: Otariidae*) from the southern hemisphere. *Journal of Parasitology*, 95(1), 156–159.
- DeLong, R.L., Orr, A.J., Jenkinson R.S. & Lyons, E.T. (2009) Treatment of northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) pups with ivermectin reduces hookworm-induced mortality. *Marine Mammal Science*, 25, 944– 948.
- Delport, T. C., Asher, A. J., Beaumont, L. J., Webster, K. N., Harcourt, R. G., & Power, M. L. (2014). *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* occurrence in Australian sea lions (*Neophoca cinerea*) exposed to varied levels of human interaction. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, 3(3), 269–75.
- Deng, M., Peterson, R., & Cliver, D. (2000). First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Parasitology*, 86(3), 490–494.
- Dixon, B. R., Parrington, L. J., Parenteau, M., Leclair, D., Santín, M., & Fayer, R. (2008). *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in the intestinal contents of ringed seals (*Phoca hispida*) and bearded seals (*Erignathus barbatus*) in Nunavik, Quebec, Canada. *Journal of Parasitology*, 94(5), 1161–1163.
- Dubey, J.P., Zarnke, R., Thomas, N.J., Wong, S.K., Van Bonn, W., Briggs, M. & Thulliez, P. (2003). *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis* canis-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*, 116, 275–296.
- Dunn, J.L. & Wolke, R.E. (1976). *Dipetalonema spirocauda* infection in the Atlantic harbor seal (*Phoca vitulina concolor*). *Journal of Wildlife Diseases*, 12, 531–538.

- Fleischman, R.W. & Squire, R.A. (1970). Verminous pneumonia in the california sea lion (*Zalophus californianus*). *Pathologica Veterinaria*, 7, 89–101.
- Forbes, L.B. (2000). The occurrence and ecology of *Trichinella* in marine mammals. *Veterinary Parasitology*, 93(3-4), 321–334.
- Forrester, D.J., Jackson, R.F., Miller, J.F. & Townsend, B.C. (1973). Heartworms in captive California sea lions. *Journal of the American Veterinary Assotiation*, 163, 568-570.
- Furtado, A.P., Melo, F.T.V, Giese, E.G. & dos Santos, J.N. (2010). Morphological redescription of *Dirofilaria immitis*. *The Journal of Parasitology*, 96(3), 499–504.
- Gage, L.J., Gerber, J.A., Smith, D.M. & Morgan, L.E. (1993). Rehabilitation and treatment success rate of california sea lions (*Zalophus californianus*) and northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) stranded along the central and northern california coast, 1984-1990. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 24(1), 41–47.
- Garibyan, L. & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133, 1–4.
- Garner, M.M., Lambourn, D.M., Jeffries, S.J., Hall, P.B., Rhyan, J.C., Ewalt, D.R., Polzin, L.M. & Cheville, N.F. (1997). Evidence of *Brucella* infection in *Parafilaroides* lungworms in a pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9, 298–303.
- Gaydos, J.K., Miller, W.A., Johnson, C., Zornetzer, H., Melli, A., Packham, A. & Conrad, P.A. (2008). Novel and canine genotypes of *Giardia duodenalis* in harbor seals ( *Phoca vitulina richardsi*). *The Journal of Parasitology*, 94(6), 1264–8.
- Geraci, J.R. & Lounsbury, V.J. (2005). *Marine mammals ashore: a field guide for strandings*. (2nd ed.). Baltimore: National Aquarium in Baltimore.
- Geraci, J.R., Fortin, J.F., Aubin, D.J.S.T. & Hicks, B.D., (1981). The seal louse, *Echinophthirius horridus*: an intermediate host of the seal heartworm, *Dipetalonema spirocauda* (Nematoda). *Canadian Journal of Zoology*, 59, 1457–1459.
- Gosselin, J-F. & Measures, L.N. (1997). Redescription of *Filaroides* (*Parafilaroides*) *gymnurus* (Railliet, 1899) (*Nematoda: Metastrongyloidea*), with comments on other species in pinnipeds. *Canadian Journal of Zoology*, 75, 359–370.
- Gosselin, J-F., Measures, L.N. & Huot, J. (1998). Lungworm (Nematoda: Metastrongyloidea) infections in canadian phocids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55, 825–834.
- Grilo, M.L.A. (2014) *Characterization of malaria infection on penguins housed in zoological collections*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da FMV/ULisboa, xii + 81 pp.
- Gulland, F.M.D., Beckmen, K., Burek, K., Lowenstine, L., Werner, L., Spraker, T., Dailey, M. & Harris, E. (1997). Nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infestation of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) stranded along the central California coast. *Marine Mammal Science*, 13, 446–459.
- Gulland, F.M.D., Haulena, M. & Dierauf, L.A. (2001). Seals and sea lions. In L.A. Dierauf & F.M.D. Gulland (Eds.), *CRC Handbook of marine mammal medicine*. (2nd ed.). (pp.791-827). Boca Raton: CRC Press.

- Hall, A. & Thompson, D. (2009). Gray seal, *Halichoerus grypus*. In W.F. Perrin, B. Würsig & J.G.M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. (2nd ed.). (pp.500-503). Burlington: Academic Press.
- Heath, C.B. & Perrin, W.F. (2009). California, Galapagos, and Japanese Sea Lions, *Zalophus californianus*, *Z. wolfebaeki*, and *Z. japonicus*. In W.F. Perrin, B. Würsig & J.G.M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. (2nd ed.). (pp.170-176). Burlington: Academic Press.
- Hendrix, C.M. & Robinson, E. (2012). The Protozoans. In C.M. Hendrix & E. Robinson, *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*. (4th ed.). (pp.149–186). Missouri: Elsevier.
- Hofmeyr, G. & Gales, N. (2008). *Arctocephalus pusillus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. Acedido em Set. 6, 2015; disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Hughes-Hanks, J. M., Rickard, L. G., Panuska, C., Saucier, J. R., O'Hara, T. M., Dehn, L., & Rolland, R. M. (2005). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in five marine mammal species. *Journal of Parasitology*, 91(5), 1225–1228.
- Kapel, C.M.O., Measures, L., Møller, L.N., Forbes, L., & Gajadhar, A. (2003). Experimental Trichinella infection in seals. *International Journal for Parasitology*, 33, 1463–1470.
- Kelly, T.R., Greig, D., Colegrove, K.M., Lowenstine, L.J., Dailey, M., Gulland, F.M. & Haulena, M. (2005). Metastrongyloid nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infection in a stranded California sea lion - a new host-parasite association. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(3), 593–598.
- Kuzmina, T.A., Hernández-Orts, J.S., Lyons, E.T., Spraker, T.R., Korniyushyn, V.V. & Kuchta, R. (2015). The cestode community in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) on St. Paul Island, Alaska. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, 4(2), 256–63.
- Kuzmina, T.A. & Kuzmin, Y. (2015). Description of *Uncinaria lyonsi* n. sp. (Nematoda: Ancylostomatidae) from the California sea lion *Zalophus californianus* Lesson (Carnivora: Otariidae). *Systematic Parasitology*, 90(2), 165–176.
- Kuzmina, T.A., Kuzmin, Y.I., Tkach, V.V., Spraker, T.R. & Lyons, E.T. (2013). Ecological, morphological, and molecular studies of *Acanthocheilonema odendhali* (Nematoda: Filarioidea) in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) on St. Paul Island, Alaska. *Parasitology Research*, 112(9), 3091–3100.
- Lan, J., Fu, Y., Yang, Z., Zhang, Z., Wang, C., Luo, L. & Yang, G. (2012). Treatment and prevention of natural heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in red pandas (*Ailurus fulgens*) with selamectin and ivermectin. *Parasitology International*, 61(2), 372–4.
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D. M., & Sogin, M. L. (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International Journal for Parasitology*, 40(9), 1063–1074.
- Lauckner, G. (1985). Diseases of Mammalia: Pinnipedia. In O. Kinne (Ed.), *Diseases of Marine Animals*, Vol. IV, Pt. 2. (pp.683–793). Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland.

- Lehnert, K., Schwanke, E., Hahn, K., Wohlsein, P. & Siebert, U. (2015). Heartworm (*Acanthocheilonema spirocauda*) and seal louse (*Echinophthirius horridus*) infections in harbour seals (*Phoca vitulina*) from the North and Baltic Seas. *Journal of Sea Research*, Article in press – Corrected proof. doi:10.1016/j.seares.2015.06.014.
- Leidenberger, S. & Boström, S. (2008). Characterization of the heartworm *Acanthocheilonema spirocauda* (Leidy, 1858) Anderson, 1992 (Nematoda: Onchocercidae) in Scandinavia. *Parasitology Research*, 104(1), 63–7.
- Leidenberger, S., Harding, K. & Härkönen, T. (2007). Phocid seals, seal lice and heartworms: a terrestrial host-parasite system conveyed to the marine environment. *Diseases of Aquatic organisms*, 77(3), 235-253.
- Leonardi, M.S. & Palma, R.L. (2013). Review of the systematics, biology and ecology of lice from pinnipeds and river otters (Insecta: Phthiraptera: Anoplura: Echinophthiriidae). *Zootaxa*, 3630(3), 445–466.
- Lopes, C.M.P. (2013). *Estudo dos parasitas gastrointestinais do sacarrabos (Herpestes ichneumon) e outros carnívoros silvestres coabitantes, com relevância em Portugal*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Lyons, E.T., DeLong, R.L., Nadler, S.A., Laake, J.L., Orr, A.J., DeLong, B.L. & Pagan, C. (2011a): Investigations of peritoneal and intestinal infections of adult hookworms (*Uncinaria* spp.) in northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) and California sea lion (*Zalophus californianus*) pups on San Miguel Island, California (2003). *Parasitology Research*, 109, 581–589.
- Lyons, E.T., Spraker, T.R., De Long, R.L., Ionita, M., Melin, S.R., Nadler, S.A. & Tolliver, S.C. (2011b). Review of research on hookworms (*Uncinaria lucasi* Stiles, 1901) in northern fur seals (*Callorhinus ursinus* Linnaeus, 1758). *Parasitology Research*, 109(2), 257-265.
- Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., Grimm, F., Magi, M., Naucke T.J. & Deplazes, P. (2013). Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites & Vectors*, 6:48.
- Marcus, A.D., Higgins, D.P., Šlapeta, J. & Gray, R. (2014). *Uncinaria sanguinis* sp. n. (Nematoda: Ancylostomatidae) from the endangered Australian sea lion, *Neophoca cinerea* (Carnivora: Otariidae). *Folia Parasitologica*, 61(3), 255–265.
- Mattiucci, S. & Nascetti, G. (2008). Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasiteco-evolutionary processes. *Advances in Parasitology*, 66, 47–148.
- McClelland, G. (1993). *Eimeria phocae* (Apicomplexa: Eimeriidae) in harbour seals *Phoca vitulina* from Sable Island, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 17(1), 1–8.
- McFarlane, R.A., Norman, R.J. & Jones, H.I. (2009). Diseases and Parasites of Antarctic and Sub-Antarctic seals. In K.R. Kerry & M.J. Riddle (Eds.). *Health of Antarctic Wildlife: A Challenge for Science and Policy*. (pp.57–93). Germany: Springer.
- Measures, L. N., & Olson, M. (1999). Giardiasis in pinnipeds from eastern Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(4), 779–782.



- Measures, L.N. (2001). Lungworms of marine mammals. In W.M. Samuel, M.J. Pybus & A.A. Kocan (Eds.), *Parasitic diseases of wild mammals*. (2nd ed.). (pp.279-300). Ames: The Iowa State University Press.
- Measures, L.N. (2014). *Anisakiosis and pseudoterranovosis: U.S. Geological Survey Circular 1393*. Acedido em Set. 10, 2015, disponível em: <http://pubs.usgs.gov/circ/1393/>
- Measures, L.N., Gosselin, J.F. & Bergeron, E. (1997). Heartworm, *Acanthocheilonema spirocauda* (Leidy, 1858), infections in Canadian phocid seals. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(4), 842-846.
- Medway, W. & Weiland, T.C. (1975). *Dirofilaria immitis* infection in a harbor seal. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 167, 549-550.
- Miller, M.A. (2008). Tissue cyst-forming coccidia of marine mammals. In R.E. Miller & M.E. Fowler (Eds.). *Zoo and wild animal medicine: current therapy, Volume 6*. (pp.319-340). Missouri: Elsevier Saunders.
- Murata, K., Yanai, T., Agatsuma, T. & Uni, S. (2003). *Dirofilaria immitis* infection of a snow leopard (*Uncia uncia*) in a Japanese zoo with mitochondrial DNA analysis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65(8), 945-947.
- Nadler, S.A., Lyons, E.T., Pagan, C., Hyman, D., Lewis, E.E., Beckmen, K., Bell, C.M., Castinel, A., DeLong, R.L., Duignan, P.J., Farinpour, C., Huntington, K.B., Kuiken, T., Morgades, D., Naem, S., Norman, R., Parker, C., Ramos, P., Spraker, T.R., & Bero-Vera, B. (2013). Molecular systematics of pinniped hookworms (Nematoda: Uncinaria): species delimitation, host associations and host-induced morphometric variation. *International Journal for Parasitology*, 43, 1119-1132.
- Nunes Petisca, J.L. & Tavares Montano, A. (1962). *A técnica de necrópsia em medicina veterinária*. Lisboa: Luso-Espanhola.
- Odell, D.K. & Wlodarski, L. (2009). Marine parks and zoos. In W.F. Perrin, B. Würsig & J.G.M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. (2nd ed.). (pp.692-696). Burlington: Academic Press.
- Oliveira, P. (2013). *Considerações sobre o clima do Algarve*. Direção Regional de Agricultura e Pescas do Algarve – Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território. Acedido em Set. 15, 2015; disponível em: <http://www.drapalg.min-agricultura.pt/ema/images/artigos/>
- Olson, M. E., Roach, P. D., Stabler, M., & Chan, W. (1997). Giardiasis in ringed seals from the western arctic. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(3), 646-648.
- Onderka, D.K. (1989). Prevalence and pathology of nematode infections in the lungs of ringed seals (*Phoca hispida*) of the western arctic of Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 25, 218-224.
- Perry, M.L. & Forrester, D.J. (1971). *Dipetalonema odendhali* (Nematoda: Filarioidea) from the northern fur seal, with a description of the microfilaria. *The Journal of Parasitology*, 57(3), 469-472.
- Perry, M.L. (1967). A new species of *Dipetalonema* from the california sea lion and a report of microfilariae from a steller sea lion (Nematoda: Filarioidea). *The Journal of Parasitology*, 53(5), 1076-1081.

- Piché, C., Measures, L., Bédard, C. & Lair, S. (2010). Bronchoalveolar lavage and pulmonary histopathology in harp seals (*Phoca groenlandica*) experimentally infected with *Otostrongylus circumlitus*. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(2), 409–421.
- Raga, J.A., Fernández, M., Balbuena J.A. & Aznar, F.J. (2009). Parasites. In W.F. Perrin, B. Würsig & J.G.M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. (2nd ed.). (pp.821-830). Burlington: Academic Press.
- Rengifo-Herrera, C., Ortega-Mora, L.M., Gómez-Bautista, M., García-Moreno, F.T., García-Párraga, D., Castro-Urda, J. & Pedraza-Díaz, S. (2011). Detection and characterization of a *Cryptosporidium* isolate from a Southern elephant seal (*Mirounga leonina*) from the Antarctic Peninsula. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1524–1527.
- Rengifo-Herrera, C., Ortega-Mora, L.M., Gómez-Bautista, M., García-Peña, F.J., García-Párraga, D. & Pedraza-Díaz, S. (2013). Detection of a novel genotype of *Cryptosporidium* in Antarctic pinnipeds. *Veterinary Parasitology*, 191, 112–118.
- Rózsa, L., Reiczigel, J. & Majoros, G. (2000). Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology*, 86, 228-232.
- Ruiz de Ybanez, M.R., Martinez-Carrasco, C., Martinez, J.J., Ortiz, J.M., Attout, T. & Bain, O. (2006). *Dirofilaria immitis* in an African lion (*Panthera leo*). *Veterinary Record*, 158, 240–242.
- Santín, M., Dixon, B.R. & Fayer, R. (2005). Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from ringed seals (*Phoca hispida*) in northern Quebec, Canada. *Journal of Parasitology*, 91(3), 712–716.
- Santos, S.S. (2011). *Análise da qualidade do pescado*. Relatório Final de Estágio do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto.
- Sato, T., Higuchi, T., Shibuya, H., Ohba, S., Nogami, S., Shirai, W., Watanabe, H. & Honda, S. (2002). Lingual squamous cell carcinoma in a California sea lion (*Zalophus californianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 33 (4), 367-370.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., Gonzalez-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E. & Montoya-Alonso, J.A. (2012). Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews (CMR)*, 25(3), 507–544.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., & Montoya-Alonso, J. A. (2012). Human and animal dirofilariasis: The emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 507–544.
- Taylor, A.E.R., Brown, D.H., Heynemann, D. & McIntyre, R.W. (1961). Biology of filarioid nematode *Dipetalonema spirocauda* (Leidy, 1858) from the heart of captive harbor seals and sea lions, together with pathology of the hosts. *Journal of Parasitology*, 47, 971–976.
- Thompson, D. & Härkönen, T. (2008a). *Phoca vitulina*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. Acedido em Ago. 26, 2015; disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Thompson, D. & Härkönen, T. (2008b). *Halichoerus grypus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. Acedido em Ago. 26, 2015; disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).

- Thompson, J., Yang, R., Power, M., Hufschmid, J., Beveridge, I., Reid, S., Ng, J., Armson, A. & Ryan, U. (2008). Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in marsupials in Australia. *Experimental Parasitology*, 120, 88–93.
- Van Bolhuis, G.H., Philippa, J.D., Gajadhar, A.A., Osterhaus, A.D., & Kuiken, T. (2007). Fatal enterocolitis in harbour seals (*Phoca vitulina*) caused by infection with *Eimeria phocae*. *Veterinary Record*, 160(9), 297–300.
- Van Bonn, W.G. (2014). Pinnipedia. In R.E. Miller & M.E. Fowler (Eds.). *Fowler's zoo and wild animal medicine*, Volume 8. (pp.436-449). Missouri: Elsevier Saunders.
- Vercruysse, J., Salomez, A., Ulloa, A., Alvinerie, M., Osterhaus, A. & Kuiken, T. (2003). Efficacy of ivermectin and moxidectin against *Otostrongylus circumlitus* and *Parafilaroides gymnurus* in harbour seals (*Phoca vitulina*). *Veterinary Record*, 152, 130–134.
- Vidal, R.A.C. (2013). Rastreio de agentes de doenças caninas de transmissão vectorial numa população de cães com funções militares e policiais. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Volokhov, D.V., Norris, T., Rios, C., Davidson, M.K., Messick, J.B., Gulland, F.M. & Chizhikov, V.E. (2011). Novel hemotrophic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary Microbiology*, 149, 262-268.
- White, G.L. (1975). *Dirofilaria immitis* and heartworm disease in the California sea lion. *The Journal of Zoo Animal Medicine*, 6(2), 23-24.
- Willi, B., Boretti, F.S., Tasker, S., Meli, M.L., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2007). From haemobartonella to hemoplasma: molecular methods provide new insights. *Veterinary Microbiology*. 125, 197–209.
- Worthy, G.A.J. (2001) Nutrition and energetic. In L.A. Dierauf & F.M.D. Gulland (Eds.), *CRC Handbook of marine mammal medicine*. (2nd ed.). (pp.791-827). Boca Raton: CRC Press.
- Zajac, A. M. & Conboy, G. A., (2012). *Veterinary Clinical Parasitology*. (8th ed.). UK: John Wiley & Sons, Inc.

## ANEXOS

### Anexo 1 – Rastreio de Dirofilariose realizado no Zoomarine durante o decorrer do estágio.

Tabela 8 – Resultados dos testes rápidos para diagnóstico de *D. immitis* realizados no Zoomarine.

#### COLECÇÃO ACTUAL

Código	Animal nº	Data Nasc.	Sexo	Amostra	Data	Resultado	Observações
<b>Foca-comum – <i>Phoca vitulina</i></b>							
A	1	08/07/2012	Macho	Plasma heparina	01/12/14	NEG	S/ sintomas
B	2	1989	Fêmea	Soro	01/12/14	POS	S/ sintomas
C	3	24/06/1996	Macho	Sangue total	30/11/14	NEG	S/ sintomas
D	4	01/07/2007	Fêmea	Soro	23/11/14	NEG	S/ sintomas
E	5	07/06/1996	Macho	Soro	23/11/14	NEG	S/ sintomas
F	6	1989	Fêmea	Sangue total	30/11/14	POS	S/ sintomas
<b>Foca-cinzenta – <i>Halichoerus grypus</i></b>							
G	1	29/12/2002	Macho	Soro	01/12/14	NEG	S/ sintomas
H	2	1990	Fêmea	Soro	01/12/14	NEG	S/ sintomas
<b>Leão-marinho californiano – <i>Zalophus californianus</i></b>							
I	1	11/06/1996	Macho	Sangue total	11/01/15	NEG	S/ sintomas
J	2	08/06/2003	Macho	Plasma heparina	01/12/14	NEG	S/ sintomas
K	3	07/06/1996	Macho	Sangue total	13/11/14	NEG	S/ sintomas
L	4	07/06/2000	Fêmea	Não foi sujeita a análise devido a falta de amostra.			
M	5	10/06/1999	Fêmea	Plasma heparina	01/12/14	NEG	S/ sintomas
N	6	12/06/2012	Macho	Plasma heparina	01/12/14	NEG	S/ sintomas
<b>Otária sul-africana – <i>Arctocephalus pusillus pusillus</i></b>							
O	1	21/05/1998	Macho	Soro	01/12/14	NEG	S/ sintomas
P	2	1992	Macho	Sangue total + Plasma	09/11/14	Duvidoso	C/ tosse
Q	3	31/05/2002	Macho	Sangue total	09/11/14	NEG	S/ sintomas
R	4	27/05/2002	Macho	Plasma	01/12/14	NEG	S/ sintomas
S	5	05/05/1996	Macho	Soro	01/12/14	NEG	S/ sintomas
T	6	1996	Macho	Soro	01/12/14	NEG	S/ sintomas

#### ÓBITOS

Animal nº	Data Nasc.	Data Morte	Sexo	Amostra	Data	Resultado	Observações
<b>Otária sul-africana – <i>Arctocephalus pusillus pusillus</i></b>							
1	1988	12/11/2013	Macho	Soro	23/11/2014	NEG	Parasitas no coração
2	1988	20/10/2014	Macho	Soro	09/11/2014	POS	Parasitas na a. pulmonar

## Anexo 2 – Resultados obtidos nas análises das amostras em estudo.

Tabela 9 – Resultados obtidos no total de amostras analisadas.

Animal	WITNESS	Knott	FA	ES	McMaster				Flutuação				Sedimentação				Baermann				EF
					1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
A	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
B	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
C	Neg.	Neg.		Duv. Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
D	Neg.	Neg.		Pos.	Neg.	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.		Neg.
E	Neg.	Neg.		Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
F	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
G	Neg.	Neg.		Duv. Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
H	Neg.	Neg.		Duv. Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
I					Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
J	Neg.	Neg.		Duv. Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
K	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
L	Neg.	Neg.		Duv. Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
M	Neg.	Neg.		Duv. Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
N	Neg.	Neg.		Duv. Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
O	Neg.	Neg.		Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
P	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Q	Neg.	Neg.		Duv. Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
R	Neg.	Neg.		Duv. Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
S	Neg.	Neg.		Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
T	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

### Legenda:

**Pos.** Resultado positivo  
**Neg.** Resultado negativo

**FA** Fosfatases ácidas  
**ES** Esfregaço sanguíneo

**EF** Esfregaço fecal  
**Duv. Pos.** Dúvida positivo

**Duv. Neg.** Dúvida negativo

### Anexo 3 – Diferenciação morfológica entre vermes do coração de pinípedes.

Tabela 10 – Algumas diferenças morfológicas entre *D. immitis* e *A. spirocauda*.

<i>Espécie</i>	<i>Dirofilaria immitis</i> (Furtado <i>et al</i> , 2010)		<i>Acantocheilonema spirocauda</i> (Leidenberger & Boström, 2008)	
<b>Sexo</b>	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>
<b>Comprimento (mm)</b>	119,4 – 162,3	177 – 272	68 – 117	97 – 197
<b>Largura (mm)</b>	0,3 – 0,5	0,40 – 0,61	0,29 – 0,39	0,32 – 0,63
<b>Esófago comprimento (mm)</b>	1,08 – 1,46	1,05 – 1,57	1,26 – 2,03	1,12 – 1,88
<b>Anel nervoso</b>	0,35 – 0,47	0,33 – 0,52	0,23 – 0,32	0,15 – 0,30
<b>Deirídeos</b>	0,29 – 0,77	0,56 – 0,97		
<b>Estrutura tipo Hemizonídeo</b>			0,28 – 0,44	0,33 – 0,51
<b>Vulva</b>		2,23 – 3,26		0,99 – 1,57
<b>Extremidade anterior</b>	Arredondada	Arredondada	Arredondada	Arredondada
<b>Cauda</b>	0,09 – 0,11 Terminação em espiral	0,15 – 0,27 Terminação arredondada	0,23 – 0,31 Ligeiramente curvada ventralmente com terminação arredondada	0,22 – 0,35 Ligeiramente curvada ventralmente com terminação arredondada
<b>Espícula grande</b>	0,31 – 0,39			
<b>Espícula pequena</b>	0,15 – 0,19			
<b>Espícula direita</b>			0,143 – 0,248	
<b>Espícula esquerda</b>			0,120 – 0,368 (parte tubular) 0,244 – 0,619 (parte membranosa)	

## Anexo 4 – Resultados de análises realizadas em laboratório externo.

Figura 28 – Resultado negativo do qPCR *Dirofilaria* realizado em sangue em EDTA, na subespécie *A. p. pusillus*.



Investigação Científica e Análises Moleculares, Lda.

Folha de Trabalho Nº **47129/164174**

Data 19-11-2014

**Dados do Animal**

Animal	Hércules
Espécie	Leão Marinho
Raça	
Microchip	
Idade	(M)
Amostra	Edta

Nome	Mundo Aquático, S.A.
Veterinário	Dra. Carla Flanagan
Localidade	8201-864 Guia - Albufeira
Telefone	289560300
Fax	
Envio	EMAIL

Proprietário Zoomarine

No Cliente: V683

Análise	Resultado	Un.	Ref.	Histórico
<b>B. MOLECULAR</b>				
RT PCR DIROFILARIA	Negativo			
Não foi detectado DNA de <i>Dirofilaria immitis</i> na amostra enviada.				

Figura 29 – Resultado negativo do qPCR *Dirofilaria* realizado em sangue em EDTA, na espécie *P. vitulina*.



Investigação Científica e Análises Moleculares, Lda.

Folha de Trabalho Nº **50536/168224**

Data 15-12-2014

**Dados do Animal**

Animal	Darky
Espécie	Leão Marinho
Raça	Foca Vitulina
Microchip	
Idade	26 A (M)
Amostra	Edta

Nome	Mundo Aquático, S.A.
Veterinário	Dra. Carla
Localidade	8201-864 Guia - Albufeira
Telefone	289560300
Fax	
Envio	EMAIL

Proprietário Zoomarine

No Cliente: V683

Análise	Resultado	Un.	Ref.	Histórico
<b>B. MOLECULAR</b>				
RT PCR DIROFILARIA	Negativo			
Não foi detectado DNA de <i>Dirofilaria immitis</i> nas amostra enviada.				

Figura 30 – Resultado negativo (ligeira reacção) do teste ELISA realizado com amostra de soro, na subespécie *A. p. pusillus*.


**DNAtech.**  
 Investigação Científica e Análises Moleculares, Lda.

Folha de Trabalho Nº **212/170608**  
 Data 03/01/2015

**Dados do Animal**

<b>Animal</b>	Hércules
<b>Espécie</b>	Leão Marinho
<b>Raça</b>	Leão Marinho
<b>Microchip</b>	
<b>Idade</b>	(M)
<b>Amostra</b>	Soro

<b>Nome</b>	Mundo Aquático, S.A.
<b>Veterinário</b>	Dra. Raquel Fernandes
<b>Localidade</b>	8201-864 Guia - Albufeira
<b>Telefone</b>	289560300
<b>Fax</b>	
<b>Envio</b>	EMAIL

No Cliente: V683

**Proprietário** Zoomarine

Análise	Resultado	Un.	Ref.	Histórico
<b>IMUNOLOGIA</b>				
<b>ANTIGENIO DIROFILARIA IMMITIS</b>	Negativo (Ligeira reacção)			
Titulação 1/32	Negativo (Ligeira reacção)			